

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos



**TESIS DOCTORAL**

**Potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* y aplicación de la  
reuterina como bioconservante alimentario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Izaskun Martín Cabrejas**

Directores

**Margarita Medina Fernández-Regatillo**  
**Juan Luis Arqués Orobón**

**Madrid, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



POTENCIAL PROBIÓTICO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* Y  
APLICACIÓN DE LA REUTERINA COMO BIOCONSERVANTE  
ALIMENTARIO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR  
Izaskun Martín Cabrejas

Directores  
Margarita Medina Fernández-Regatillo  
Juan Luis Arqués Orobón

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

POTENCIAL PROBIÓTICO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* Y  
APLICACIÓN DE LA REUTERINA COMO BIOCONSERVANTE  
ALIMENTARIO

Memoria presentada por **Izaskun Martín Cabrejas** para la obtención del grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid

Directores: Dra. Margarita Medina Fdez-Regatillo y Dr. Juan Luis Arqués Orobón  
Departamento de Tecnología de Alimentos  
INIA

EL DOCTORANDO

VºBº LOS DIRECTORES





Margarita Medina Fernández-Regatillo, Investigador Científico, y Juan Luis Arqués Orobón, Científico Titular, del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA,

CERTIFICAN: Que la tesis titulada “Potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* y aplicación de la reuterina como bioconservante alimentario” de la que es autora Izaskun Martín Cabrejas, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 12 de abril de 2016

Fdo. Margarita Medina

Fdo. Juan Luis Arqués



Izaskun Martín Cabrejas ha sido beneficiaria de la ayuda BES-2011-046941 del Subprograma de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación (FPI-MICINN 2011) para la realización de la Tesis Doctoral.

El trabajo se ha enmarcado en los proyectos AGL2010-16600 “Antimicrobianos biológicos en seguridad alimentaria: reuterina, sistema lactoperoxidasa y lactoferrina”, RTA2010-00116-00-00 “Desarrollo de quesos probióticos y evaluación de su efecto protector frente a patógenos alimentarios en un modelo *in vivo*” y RTA2013-00070-C03-01 “*Listeria monocytogenes* en jamón curado deshuesado: caracterización de la contaminación y control mediante altas presiones y bioconservación”.



A mi armada  
A mi tía eterna



Mis primeros agradecimientos los brindaré a mis dos directores de tesis; Muchas gracias Marga por haberme elegido para formar parte de este proyecto, por tu cariño, comprensión y humanidad siempre que lo he necesitado. A Juan, por haberme mostrado ese ímpetu, esa esencia de científico entusiasta que todos tenemos forjada en nuestra mente. A los dos, gracias por los conocimientos que me habéis transmitido.

Dentro del departamento de Tecnología de Alimentos he conocido a grandes personas y he pasado momentos geniales que voy a llevar siempre conmigo. Me llamó la atención desde el primer día la disponibilidad de cada uno de vosotros por querer ayudar siempre (o casi!) en el laboratorio, gracias a todos por el tiempo que me habéis dedicado. La amistad de muchos de vosotros es lo más bonito que me llevo de estos años.

Gracias Rakel por todo el tiempo que hemos pasado juntas, porque eres tan buena científica como buena amiga, eskerrik asko de corazón por todo lo que has aportado a mi vida, no solo a nivel profesional, sino también al personal.

Gracias querida Natalia, por haberme abierto tu corazón, por tu ayuda, por tu amistad (que es un tesoro), eres muy grande y llegarás lejos.

Pichuuu! zenkiu soumach! Sabes que cuando llegaste al INIA el departamento se volvió más alegre y risueño, me lo paso genial contigo, tu cariño me ayuda día a día.

Esos pedazo de doctores Calzada y Del Olmo, ¡menudos currantes, buenos profesionales y mejores personas estáis hechos! Por vuestro apoyo, vuestro ánimo, por el jade power, danke!

Isa, gracias por tu buen rollo diario y tus conocimientos, de verdad ¡VIVA la gente optimista! Gracias Susana por tu paciencia en mis primeros meses en el lab, a Marta porque siempre tienes palabras que animan (¡gracias pochola!), a Sonia por su profesionalidad, a Máximo por tener tan buenos sentimientos y aportar ese toque de fantasía a la vida, a Ana Secre por su eficiencia y saber estar, a Tomi ¡por majo!, a Pilar Gaya por su vitalidad y por sacarme parecido con Belén, a Chiqui por ser tan atenta, a Chema por sus conocimientos biotecnológicos, a Eva y a Ángela por su dulzura y por ser tan buenas docentes, a Jo por su disposición y por ser tan súper!, a Claudia, a Dani, Manolo, Sagrario, Pilar López, Nerea, Joaquín, Olga, Lucía, Carmen Burbano, Carmen Cuadrado, Blanca etc.

I want to thank to Arjan Narbad and Melinda Mayer who helped me in the experiments I did during a short-term-fellowship in the I.F.R., Norwich. They were so kind to accept me to work in their team, and the experience was so enjoyable not only in the scientific issue but also in the personal. Thanks as well to Adrian, Gwen, Maite, Christina, Fatma, Carmen and my



lovely housemates: Francesca, Sam and Alex. Specially thanks to Xavi and Joaquin (empanao!) because of the funniest moments.

Agradeceré también al gran equipo de Julio Gálvez en el CIBHER, Granada, su trabajo en experimentación animal: Pepe, Francesca, Alba y Teresa por su esfuerzo y simpatía. Olé con la profesionalidad y efectividad de Galvez Team!

A Ana María García del centro de Calidad de los Alimentos del INIA de Soria por su ayuda con los ELISA y a Mati por ser tan amable conmigo.

A M<sup>a</sup> Luisa Fernández y Chema Navas, del dpto. de Medio Ambiente del INIA por su ayuda en los ensayos de citotoxicidad.

A Manuela Fernández, a Eva Hierro y a Xavi por su ayuda con los trámites en veterinaria.

Durante los años de la universidad me dejé seducir por la ciencia y hacer el doctorado se convirtió en un sueño para mí. Comencé en los laboratorios de tecno de Zaragoza donde Silvi huevi llena de energía y positivismo me dio a conocer este mundo, seguí en INTA (gracias Yanina, Naty, Gabi, tia Paulis, Leandro por su rebuena onda!) ese verano loco argentino de la mano de la ya doctora Luengo, y luego vino Vitoria y el curioso mundo del ajo. Gracias Iosi por ayudarme en la decisión más difícil, y gracias Lau, Miriam, Majo, Maggi, David, por ese año maravilloso y las amistades que conservo. No me olvido de mi paso por TRASA, de Pedro y de José Ramón, muchas gracias por todo. Venirme a Madrid supuso un gran cambio en mi vida y el abandono de un interesante proyecto en el que me había embarcado poco antes de que me concediesen la beca, pero no pude negarme.

Fuera del mundo científico no existe Izaskun sin familia, si, soy muy familiar, es lo mejor que me ha dado la vida, tener una familia buena y unida: mi armada.

Mis padres son lo máximo, indescriptible su labor tenaz y perseverante con mi educación, me hace feliz saber que la cercana y cálida relación que me une a ellos bien se asemeja a la más bella de las amistades. Mi madre por ser una persona inteligente, entregada y sacrificada hasta el límite, y mi padre, mi maestro, por seguir enseñándome siempre. Incansables gracias. También gracias a mis segundos padres, Ángel y Maria Luisa que me han transmitido los valores de la generosidad y del amor. Tía, nunca te irás del todo porque sigues viva y presente en cada uno de nosotros. La pena más grande de mi tesis es que no la puedas ver, porque sé que serías la persona que más la hubiese engrandecido. A mi tata y a Jani porque siempre que os necesito estáis, y porque os necesito mucho. Gracias por darme a Nahia y a Unai, mis dos pequeños tesoros, que me han sabido dar una fuerza inmensa desde que sólo eran un proyecto.

A mis abuelos, porque han sido el origen de todos nosotros. A mi tía Ana (por tu energía en forma de arroz con leche!), a mi tía Mari Carmen, Juan Jesús y Chato, a mis primos: Pili, Vanesa, Lorena, María, Ramiro y respectivos.

A la familia de Edu, sobre todo a Eduardo y a Inés por quererme, por ser tan buenos conmigo y por haber tenido un hijo tan guapo y bonachón, a Ángela, ya te queda menos, ánimo! A la Dra Picazo, a Quilla y a los espinariegos.

A mis amigos de Cortes: Edu, María, Mapi (y garbancito), Patri, Noni (furrlove!), Adri, Mertxe, la peña de arriba, Patri y Bea Martinez y un largo etc.

A mis amigas divinas: Anna y Gabi por manteneros con el paso de los años, y porque ¡oh! Vaya lío los amigos de mis amigas son mis amigos. Gracias también a Cris, a Fran, a Sole, al tándem Vení por la magia que dejáis como una estela a vuestro paso.

A mis grandes amigas de la uni: komando pirineos, os quiero. Frago, gracias por tus ánimos.

A la amistad indestructible que se forjó en Erasmus: Piccolina, Cuore, Reketepaupau, Mario, Jesús. Os agradezco no solo las grandes vivencias que compartimos, sino vuestra amistad hoy.

A Zutik Mairiz, porque oh música! Tu siempre me fuiste fiel.

A FACE, esa aventura ilusionante que acaba de empezar, por confiar en mí desde el minuto 0.

Y sobre todo quiero agradecer esta tesis de manera muy especial a Edu, mi gran descubrimiento. Buena parte de esta tesis también ha sido de manera indirecta, escrita bajo tu puño. Has sido mi apoyo incondicional y la razón de no venirme abajo a lo largo de todos los momentos duros y difíciles que han pasado en los últimos años, que desgraciadamente, no han sido pocos. Has escuchado mejor que nadie, día tras día, cada una de mis desmotivaciones, y has sabido darles la vuelta para sacar la parte positiva aunque pareciese imposible. Tu bondad y tus ganas de intentar hacer más fácil la vida de los que quieres te hacen único. Junticos, de la mano, seguiremos siendo felices y podremos con lo que nos echen.

La gratitud según la RAE es un sentimiento que nos obliga a estimar el beneficio o favor que se nos ha hecho o ha querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera.

Me gustaría corresponderos a todos los que me habéis ayudado en algún momento, pero la tesis, aunque cuesta creerlo, es un trabajo de síntesis, que no estés dentro de este apartado no significa que no te lo agradezca, si estás leyendo mi tesis, estás valorando mi trabajo, GRACIAS.



“Cuando se abre la puerta de la comunicación, todo es posible...”

Tich Nhat Hanh



Nowadays, the consumer demands less processed foods, being more natural and having a longer shelf-life. This trend has increased the consumption of ready-to-eat (RTE) products, which are consumed without further hygienization treatments. RTE foods are susceptible of contamination by food-borne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 H7 during processing and handling, representing a risk for consumers. In the present work reuterin (REU), an antimicrobial compound produced by some strains of *Lb. reuteri* during the anaerobic metabolism of glycerol, has been proposed as a biopreservative to increase the food safety of RTE products. Reuterin was produced, purified and added to RTE products individually or combined with high hydrostatic pressure (HHP). Besides, other biopreservatives like lactoperoxydase system (SLP) or lactoferrin (LF) were combined with the HHP. The reuterin cytotoxicity was assayed with Hep G2 cell line. Furthermore, the antimicrobial effect of *in situ* produced reuterin by the addition of *Lb. reuteri* INIA P572 as a bioprotective culture plus glycerol in the manufacture of cheese and the influence on cheese characteristics was investigated. Finally, the *Lb. reuteri* INIA P572 probiotic properties were researched *in vitro*, in a colonic model, using a cell line and by a mouse model of ulcerative colitic induced by dextran sodium sulphate.

Cold smoked salmon and cooked ham were studied such as RTE products, by adding the three biopreservatives (REU, SLP y LF) with HHP (450 MPa/ 5 min) in order to check their antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 and the influence on the characteristics of the products. Reuterin in cold smoked salmon and cooked ham showed a bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* and bactericidal activity against *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis*. The combined treatment with HHP attained approximately 4 log units reductions of *L. monocytogenes* and higher with the rest of the pathogens. In cold smoked salmon reuterin alone and combined with HHP avoided the formation of biogenic amines. REU and SLP applied individually or combined with HHP reduced total viable counts, affecting slightly the colour and texture.

Our cytotoxicity assay in a human hepatoma Hep G2 cell line showed that reuterin presented a moderate toxicity profile *in vitro*, being much less toxic than acrolein and only four times more toxic than diacetyl.

*Lb. reuteri* INIA P572 was selected as adjunct culture for the manufacture of cheese and glycerol concentration optimized to 100 mM. The addition of *Lb. reuteri* INIA P572 as bioprotective culture plus glycerol with the commercial lactic culture in cheese manufacture get a reuterin production of approximately 5  $\mu\text{mol/g}$  in cheese, which was enough to inactivate *L. monocytogenes* from the first week and *E. coli* O157:H7 from the first day of the ripening period. A decrease in total viable counts, a lower level of proteolysis and the presence of reuterin related volatile compounds were detected in cheese with the adjunct culture.

Survival to gastrointestinal conditions *in vitro*, and the ability of producing reuterin in a colonic model system without affecting the main microbial population in the human gut microbiota was verified. *Lb. reuteri* INIA P572 was able to stimulate the production of nitric oxide, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in RAW 264.7 cell line. No immunomodulatory effect was registered by *Lb. reuteri* after stimulation of the macrophages with lipopolysaccharide. The anti-inflammatory effect of *Lb. reuteri* INIA P572 in a model of mouse colitis was proved because of the decrease in the colonic tissue damage and the decrease of the inflammatory related markers expression compared to control mouse.

Actualmente, el consumidor demanda alimentos menos procesados, más naturales y con una mayor vida útil. Esta tendencia ha aumentado el consumo de productos RTE (del inglés ready-to-eat), alimentos que se consumen directamente sin tratamiento higienizante o con un procesado mínimo, siendo susceptibles de contaminación con microorganismos patógenos durante el procesado y manipulación. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 pueden entrar en contacto con los RTE en las operaciones anteriores, entrañando un riesgo para el consumidor.

En el presente trabajo se ha propuesto la reuterina (REU), un compuesto antimicrobiano producido por algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* durante el metabolismo anaerobio del glicerol, como bioconservante en alimentos RTE. Para ello, la reuterina se ha producido y purificado, añadiéndose a los alimentos de forma individual y en combinación con las altas presiones hidrostáticas (APH). Además, se han empleado otros bioconservantes como el sistema lactoperoxidasa (SLP) o la lactoferrina (LF) junto con las APH. La citotoxicidad de la reuterina se ha investigado mediante el empleo de células Hep G2. Asimismo, se ha comprobado el efecto antimicrobiano de la reuterina producida *in situ* mediante la adición de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo bioprotector y glicerol en la elaboración de productos lácteos, así como su impacto en las características del queso. Finalmente, se ha evaluado el potencial probiótico de *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo de colon, en cultivos celulares y en un modelo murino de colitis ulcerosa inducida por sulfato de dextrano sódico.

Se estudió el efecto antimicrobiano de los tres bioconservantes (REU, SLP y LF) junto con las APH (450 MPa/ 5 min) frente a *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en salmón ahumado y jamón cocido y su influencia sobre las características de los productos. La reuterina ejerció un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* y bactericida frente a *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* en jamón cocido y en salmón ahumado. En combinación con APH se consiguieron reducciones de aproximadamente 4 unidades logarítmicas para *L. monocytogenes* y superiores para el resto de patógenos. En salmón ahumado, se consiguió además reducir la formación de aminas biógenas tanto con la reuterina aplicada individualmente como combinada con las altas presiones hidrostáticas. La reuterina y el



sistema lactoperoxidasa, individualmente o en combinación con altas presiones, redujeron los niveles de microorganismos totales en ambos productos, afectando ligeramente al color y la textura.

Los niveles de toxicidad de la reuterina fueron muy inferiores a los de la acroleína y cuatro veces superiores a los del diacetilo, un saborizante empleado en la industria alimentaria.

Se seleccionó la cepa de *Lb. reuteri* INIA P572 para la fabricación de productos lácteos y se optimizó la concentración de glicerol a 100 mM para obtener un rendimiento máximo en la producción de reuterina. El empleo de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo adjunto bioprotector junto con glicerol en la elaboración de quesos dio lugar a una producción de reuterina de aproximadamente 5  $\mu\text{mol/g}$ , concentración suficiente para inactivar a *L. monocytogenes* desde la primera semana y *E. coli* O157:H7 desde el primer día de maduración en el queso. Se detectó una disminución en los niveles de microorganismos totales en el queso, una menor proteólisis y la presencia de varios compuestos volátiles relacionados con la reuterina.

Por último, se investigó el potencial probiótico de *Lb. reuteri* INIA P572. Se comprobó su supervivencia a condiciones gastrointestinales ensayadas *in vitro* y su capacidad de producción de reuterina en un modelo de simulación de colon sin afectar a las poblaciones microbianas mayoritarias de la microbiota fecal humana. Tras el estudio de las propiedades inmunomoduladoras mediante macrófagos RAW 264.7, *Lb. reuteri* INIA P572 mostró capacidad de estimular la producción de óxido nítrico TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  y IL-6. No obstante, no se observó disminución de estas citoquinas al tratar la línea celular con el probiótico antes de la estimulación con lipopolisacáridos. Asimismo, en un modelo de colitis ulcerosa en ratones, se observó una mejora del índice DAI así como una reducción del daño del tejido colónico derivado de la enfermedad y una disminución en la expresión de marcadores implicados en el proceso de inflamación celular, en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572.











ABSTRACT/ RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS	3
1.1.1. Principales microorganismos patógenos asociados a alimentos	4
1.1.1.1. <i>Campylobacter</i>	4
1.1.1.2. <i>Salmonella</i>	5
1.1.1.3. <i>Yersinia enterocolítica</i>	6
1.1.1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.1.1.5. <i>Escherichia coli</i>	8
1.1.2. Estrategias de conservación de alimentos alternativas a los tratamientos térmicos	9
1.1.2.1. Tecnologías no térmicas	9
1.1.2.1.1. Altas presiones hidrostáticas (APH)	9
1.1.2.1.1.1. Efecto de las altas presiones sobre los microorganismos	11
1.1.2.1.1.2. Efecto de las altas presiones sobre los alimentos	12
1.1.2.1.2. Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)	13
1.1.2.1.3. Radiaciones ionizantes	13
1.1.2.1.4. Envasado en atmósferas protectoras	14
1.1.2.2. Bioconservación	14
1.1.2.2.1. Cultivos bioprotectores	14
1.1.2.2.2. Bacteriocinas	15
1.1.2.2.3. Reuterina	16
1.1.2.2.3.1. Producción	17
1.1.2.2.3.2. Modo de acción	19
1.1.2.2.3.3. Aplicación como bioconservante	19
1.1.2.2.4. Sistema lactoperoxidasa (SLP)	21
1.1.2.2.5. Lactoferrina (LF)	22
1.1.2.2.6. Diacetilo	23
1.1.2.3. Tratamientos combinados de inactivación de patógenos	24
1.2. ALIMENTOS FUNCIONALES: PROBIÓTICOS	26

1.2.1. Microbiota intestinal	27
1.2.2. Probióticos	29
1.2.2.1. Evaluación de microorganismos probióticos	31
1.2.3. <i>Lactobacillus reuteri</i>	33
1.2.3.1. Producción de sustancias antimicrobianas	34
1.2.3.2. Efectos beneficiosos atribuidos a <i>Lb. reuteri</i>	35
1.3. OBJETIVOS	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1. MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	41
2.1.1. Bacterias lácticas	41
2.1.2. Bacterias patógenas	41
2.1.3. Medios y condiciones de cultivo	41
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>LB. REUTERI</i> PRODUCTORAS DE REUTERINA	44
2.2.1. Caracterización genotípica	44
2.2.2. Producción de reuterina en leche	44
2.2.3. Producción de reuterina en productos lácteos modelo	45
2.2.3.1. Queso	45
2.2.3.2. Yogur	45
2.2.3.3. Análisis microbiológicos	45
2.2.3.4. pH	46
2.2.3.5. Determinación de reuterina	46
2.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA	46
2.3.1. Producción de reuterina	46
2.3.2. Purificación de reuterina	46
2.3.3. Cuantificación de reuterina	48
2.3.4. Actividad antimicrobiana	48



2.4. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA REUTERINA	49
2.4.1. Cultivos celulares y reactivos químicos	49
2.4.2. Ensayos de citotoxicidad	50
2.5. APLICACIÓN DE LA REUTERINA COMO BIOCONSERVANTE	51
2.5.1. Efecto combinado de reuterina y diacetilo sobre microorganismos patógenos	51
2.5.1.1. Actividad antimicrobiana de reuterina producida <i>in situ</i> en combinación con diacetilo	52
2.5.1.2. Determinación de la cinética de inactivación de reuterina purificada en combinación con diacetilo	52
2.5.1.3. Actividad antimicrobiana de reuterina purificada en leche en combinación con diacetilo	53
2.5.2. Inactivación de microorganismos patógenos en salmón ahumado mediante bioconservantes y altas presiones	53
2.5.2.1. Análisis microbiológicos	56
2.5.2.2. Análisis físico-químicos	56
2.5.2.3. Análisis de textura	56
2.5.2.4. Análisis de color	56
2.5.2.5. Determinación de la formación de aminas biógenas	57
2.5.3. Inactivación de microorganismos patógenos en jamón cocido mediante bioconservantes y altas presiones	58
2.5.3.1. Análisis microbiológicos	58
2.5.3.2. Análisis físico-químicos	58
2.5.3.3. Análisis de textura	58
2.5.3.4. Análisis de color	58
2.6. DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR DE <i>LB. REUTERI</i> INIA P572 PARA SU APLICACIÓN EN QUESOS	59
2.6.1. Optimización de la producción de reuterina en quesos con distintas concentraciones de glicerol	59
2.6.1.1. Análisis microbiológicos	60
2.6.1.2. Análisis físico-químicos	60
2.6.1.3. Determinación de reuterina	60
2.6.1.4. Análisis del color	61
2.6.2. Inactivación de patógenos mediante la adición del cultivo bioprotector	

<i>Lb. reuteri</i> INIA P572	61
2.6.2.1. Análisis microbiológicos	62
2.6.2.2. Análisis físico-químicos	62
2.6.3. Efecto de la adición del cultivo bioprotector de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en las características de los quesos	62
2.6.3.1. Análisis microbiológicos	62
2.6.3.2. Análisis físico-químicos	62
2.6.3.3. Determinación de la proteólisis	62
2.6.3.4. Determinación de compuestos volátiles	63
2.7. PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE <i>LB. REUTERI</i> INIA P572	64
2.7.1. Supervivencia en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	64
2.7.2. Producción de reuterina en un modelo de colon	65
2.7.3. Estudio de la actividad inmunomoduladora de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en cultivos celulares de macrófagos murinos RAW 264.7	66
2.7.3.1. Producción de óxido nítrico (NO)	67
2.7.3.2. Viabilidad celular	67
2.7.3.3. Producción de citoquinas	68
2.7.4. Actividad probiótica <i>in vivo</i>	68
2.7.4.1. Efecto de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en un modelo <i>in vivo</i> de colitis experimental	69
2.7.4.2. Valoración del proceso inflamatorio intestinal	70
2.7.4.3. Estudio histológico	71
2.7.4.4. Expresión génica de biomarcadores en tejido colónico mediante qRT-PCR	71
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
3.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE REUTERINA	76
3.1.1. Diferenciación de los aislados de <i>Lb. reuteri</i> mediante PFGE	76
3.1.2. Producción de reuterina en leche y productos lácteos modelo	77
3.1.2.1. Leche	77
3.1.2.2. Queso	78

3.1.2.3. Yogur	79
3.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA	83
3.2.1. Producción de reuterina	83
3.2.2. Purificación de reuterina	84
3.2.3. Cuantificación y actividad antimicrobiana	85
3.3. TOXICIDAD DE LA REUTERINA	85
3.3.1. Ensayos de citotoxicidad	85
3.4. EFECTO DE LA REUTERINA Y EL DIACETILO EN MEDIO DE CULTIVO Y EN LECHE FRENTE A <i>L. MONOCYTOGENES</i> , <i>S. ENTERITIDIS</i> Y <i>E. COLI</i> O157:H7	88
3.4.1. Actividad antimicrobiana de la reuterina producida <i>in situ</i> en combinación con diacetilo	87
3.4.2. Determinación de la cinética de inactivación de la reuterina purificada en combinación con diacetilo	89
3.4.3. Actividad antimicrobiana en leche de la reuterina purificada y el diacetilo frente a microorganismos patógenos	92
3.5. INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN SALMÓN AHUMADO MEDIANTE BIOCONSERVANTES Y ALTAS PRESIONES	94
3.5.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	95
3.5.2. Efecto frente a <i>S. Enteritidis</i> y <i>E. coli</i> O157:H7	97
3.5.3. Efecto sobre los microorganismos totales	101
3.5.4. Efecto en las características del salmón ahumado	103
3.5.4.1. pH y $a_w$	103
3.5.4.2. Textura	105
3.5.4.3. Color	106
3.5.4.4. Formación de aminas biógenas	108
3.6. INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN JAMÓN COCIDO MEDIANTE BIOCONSERVANTES Y ALTAS PRESIONES	112

3.6.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Enteritidis</i> y <i>E. coli</i> O157:H7	112
3.6.2. Efecto en los microorganismos totales	119
3.6.3. Efecto en las características del jamón cocido	122
3.6.3.1. pH y $a_w$	122
3.6.3.2. Textura	123
3.6.3.3. Color	125
 3.7. DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR DE <i>LB. REUTERI</i> INIA P572 EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS	 128
3.7.1. Optimización de la producción de reuterina en queso	128
3.7.1.1. Producción de reuterina	128
*      3.7.1.2. <i>Lb. reuteri</i> INIA P572	129
3.7.1.3. Cultivo láctico iniciador comercial	130
3.7.1.4. Color	131
3.7.2. <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 como cultivo bioprotector frente a microorganismos patógenos en queso	132
3.7.2.1. Producción de reuterina	132
3.7.2.2. <i>Lb. reuteri</i> INIA P572	132
3.7.2.3. Microorganismos totales	133
3.7.2.4. pH	134
3.7.2.5. <i>L. monocytogenes</i>	134
3.7.2.6. <i>E. coli</i> O157:H7	136
3.7.3. Efecto de la adición de <i>Lb. reuteri</i> y glicerol en las características del queso	137
3.7.3.1. Producción de reuterina	137
3.7.3.2. <i>Lb. reuteri</i> INIA P572	138
3.7.3.3. Microorganismos totales	138
3.7.3.4. pH	139
3.7.3.5. Proteolisis	140
3.7.3.6. Compuestos volátiles	142
 3.8. PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE <i>LB. REUTERI</i> INIA P572	 145
3.8.1. Supervivencia a condiciones gastrointestinales	145

3.8.2. Producción de reuterina en un modelo de simulación de colon <i>in vitro</i>	146
3.8.2.1. Producción de reuterina	146
3.8.2.2. Supervivencia de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572	148
3.8.2.3. Supervivencia de las bacterias de la microbiota	149
3.8.3. Actividad inmunomoduladora en cultivos celulares de macrófagos RAW 264.7	152
3.8.2.1. Producción de NO	152
3.8.2.2. Viabilidad celular	154
3.8.2.3. Producción de citoquinas	154
3.8.4. Valoración del efecto de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en un modelo <i>in vivo</i> de colitis experimental	159
3.8.4.1. DAI	159
3.8.4.2. Expresión génica de marcadores moleculares en tejido colónico	161
3.8.4.3. Estudios histológicos	164
 4. CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES	 168
 5. BIBLIOGRAFÍA	 175



<b>Tabla 1.</b> Baremo del índice de enfermedad (DAI)	70
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR de los ensayos de tejido colónico	72
<b>Tabla 3.</b> Producción de reuterina (mmol/l) por <i>Lb. reuteri</i> en leche con el Cultivo láctico comercial (CLC) MA 016 y distintas concentraciones de glicerol (0-250 mM) tras 24 h a 37 °C en anaerobiosis.	77
<b>Tabla 4.</b> Producción de reuterina (mmol/l) en queso modelo con <i>Lb. reuteri</i> como adjunto al CLC.	78
<b>Tabla 5.</b> Recuentos (log ufc/ml) de <i>L. lactis</i> y <i>Lb. reuteri</i> en quesos modelo Con <i>Lb. reuteri</i> como adjunto al CLC.	79
<b>Tabla 6.</b> Producción de reuterina (mmol/l) en yogur modelo con <i>Lb. reuteri</i> como adjunto al CLC	80
<b>Tabla 7.</b> Recuentos (log ufc/ml) de <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Lb. reuteri</i> en yogur modelo con <i>Lb. reuteri</i> como adjunto al CLC	81
<b>Tabla 8.</b> Concentración de reuterina en los sobrenadantes del cultivo de <i>Lb. reuteri</i> INIA P579 con 100 mM glicerol	84
<b>Tabla 9.</b> Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y fase de latencia ( $\lambda$ ) de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> en presencia de distintas concentraciones de reuterina y diacetilo tras 24 h a 37 °C	90
<b>Tabla 10.</b> Recuentos (log ufc/ml) de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> en leche con reuterina (1 UA/ml) en combinación con distintas concentraciones de diacetilo (0-250 mg/kg) a pH normal de la leche y a pH ácido (5,0) tras 6 y 24 h de incubación a 37 °C	92
<b>Tabla 11.</b> Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con REU (8 UA/g) y altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min y su combinación almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	95
<b>Tabla 12.</b> Recuentos de <i>S. Enteritidis</i> (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	97
<b>Tabla 13.</b> Recuentos de <i>E. coli</i> (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	98

<b>Tabla 14.</b> Recuentos de microorganismos totales (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	101
<b>Tabla 15.</b> Valores de pH en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	104
<b>Tabla 16.</b> Valores de $a_w$ en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	105
<b>Tabla 17.</b> Fuerza al corte (N) en salmón tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	105
<b>Tabla 18.</b> Parámetros de color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ) del salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	107
<b>Tabla 19.</b> Contenido en aminas biógenas (mg/kg) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	111
<b>Tabla 20.</b> Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	113
<b>Tabla 21.</b> Recuentos de <i>S. Enteritidis</i> (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	115
<b>Tabla 22.</b> Recuentos de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	116



<b>Tabla 23.</b> Recuentos de microorganismos totales O157:H7 (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	120
<b>Tabla 24.</b> Valores de pH en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	122
<b>Tabla 25.</b> Valores de $a_w$ en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	123
<b>Tabla 26.</b> Determinación de la fuerza al corte de la muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF,0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	124
<b>Tabla 27.</b> Valor $L^*$ en las muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	125
<b>Tabla 28.</b> Valor $a^*$ en las muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	126
<b>Tabla 29.</b> Valor $b^*$ en las muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d	127
<b>Tabla 30.</b> Producción de reuterina ( $\mu\text{mol/g}$ ) en quesos inoculados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 como adjunto al CLC y distintas concentraciones de glicerol	128
<b>Tabla 31.</b> Recuentos de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 (log ufc/g) en quesos con distintas concentraciones de glicerol	129
<b>Tabla 32.</b> Recuentos del CLC (log ufc/g) en los quesos con distintas concentraciones de glicerol	130
<b>Tabla 33.</b> Recuentos de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 (log ufc/g) en quesos inoculados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	133

<b>Tabla 34.</b> Recuento de microorganismos totales (log ufc/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	133
<b>Tabla 35.</b> Valores de pH en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	134
<b>Tabla 36.</b> Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	134
<b>Tabla 37.</b> Recuentos de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	136
<b>Tabla 38.</b> Recuentos de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 (log ufc/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	138
<b>Tabla 39.</b> Recuento de microorganismos totales (log ufc/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	139
<b>Tabla 40.</b> Valores de pH en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	139
<b>Tabla 41.</b> Principales fracciones proteicas (mg/g) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	141
<b>Tabla 42.</b> Proteolisis total (A340 nm) en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	142
<b>Tabla 43.</b> Compuestos volátiles en quesos con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572, glicerol 100 mM y <i>Lb. reuteri</i> con glicerol	144
<b>Tabla 44.</b> Recuento de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 tras fermentación durante 24 h en el simulador de colon	148
<b>Tabla 45.</b> Recuento de las poblaciones de la microbiota humana (log ufc/ml) en un simulador de colon junto con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 adicionado individualmente o en combinación con glicerol	151

<b>Figura 1.</b> Ejemplo de productos funcionales existentes en el mercado	3
<b>Figura 2.</b> Etapas del proceso de presurización	10
<b>Figura 3.</b> Máquina de altas presiones de Hiperbaric	12
<b>Figura 4.</b> Metabolismo del glicerol y del sistema HPA	18
<b>Figura 5.</b> Microorganismos que se encuentran en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal	28
<b>Figura 6.</b> Representación de algunos de los posibles efectos que los probióticos pueden ejercer en el hospedador	30
<b>Figura 7.</b> Selección de criterios para probióticos	32
<b>Figura 8.</b> Esquema de la purificación de la reuterina	47
<b>Figura 9.</b> Muestra de salmón con reuterina	53
<b>Figura 10.</b> Equipo de altas presiones	55
<b>Figura 11.</b> Colorímetro CM-700d (Konica Minolta)	59
<b>Figura 12.</b> Esquema de fabricación de quesos	60
<b>Figura 13.</b> Esquema de fabricación de quesos con patógenos	61
<b>Figura 14.</b> Simulador de colon del IFR	66
<b>Figura 15.</b> Distintas fases de estudio del kit ELISA	68
<b>Figura 16.</b> Diseño experimental del modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS	70
<b>Figura 17.</b> Clasificación de los aislados de <i>Lb. reuteri</i> según los pulsotipos obtenidos	76
<b>Figura 18.</b> Pulsotipos de <i>Lb. reuteri</i> caracterizados por PFGE con <i>Apal</i> y <i>SmaI</i>	76
<b>Figura 19.</b> Recta patrón de acroleína	83
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de la reuterina purificada	84
<b>Figura 21.</b> Resultados de la citotoxicidad de la reuterina, acroleína y diacetilo para los ensayos de AlamarBlue (AM), carboxifluoresceína diacetato (CFDA) y Neutral Red uptake (NR)	86
<b>Figura 22.</b> Halos de inhibición de <i>Lb. reuteri</i> INIA 572 e INIA P579 frente a <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	88
<b>Figura 23.</b> Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo	91
<b>Figura 24.</b> Curva de crecimiento de <i>S. Enteritidis</i> con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo	91

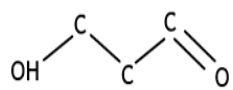
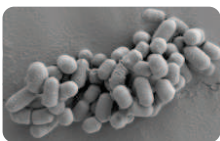
<b>Figura 25.</b> Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo	91
<b>Figura 26.</b> Gráfico de recuento de <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 sometido a condiciones gastrointestinales	146
<b>Figura 27.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN del patrón de reuterina, y el fermentador dónde se produjo reuterina <i>in situ</i> a las 0 y a las 24 h de estudio	147
<b>Figura 28.</b> Producción de NO (µg/ml) en un cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 estimulado con LPS (1 µg/ml, 100 y 10 ng/ml), <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG	152
<b>Figura 29.</b> Producción de NO (µg/ml) en un cultivo celular de macrófagos RAW 264 incubados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG durante 1 h y estimulados posteriormente con LPS (1 µg/ml)	153
<b>Figura 30.</b> Viabilidad celular (%) de macrófagos murinos RAW 264.7 frente a <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG	154
<b>Figura 31.</b> Producción de TNF-α (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG, y posteriormente estimulados con LPS (1 µg/ml)	155
<b>Figura 32.</b> Producción de IL-1β (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG, y posteriormente estimulados con LPS (1 µg/ml)	156
<b>Figura 33.</b> Producción de IL-6 (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 y <i>Lb. rhamnosus</i> GG, y posteriormente estimulados con LPS (1 µg/ml)	156
<b>Figura 34.</b> Gráfico del DAI durante los 6 días anteriores al sacrificio de los ratones no colíticos, control colíticos y tratados con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 a los que se les indujo colitis	160
<b>Figura 35.</b> Efecto del tratamiento con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en un modelo murino de colitis inducida por DSS en la expresión del ARNm de los marcadores de IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP-9, iNOS, ICAM-1, MCP-1, cuantificados mediante PCR a tiempo real	163
<b>Figura 36.</b> Efecto del tratamiento con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572 en un modelo murino de colitis inducida por DSS en la expresión del ARNm de los marcadores de MUC-2, MUC-3, ZO-1, occludina cuantificados mediante PCR a tiempo real	164
<b>Figura 37.</b> Cortes histológicos de segmentos de colon teñidos con hematoxilina/eosina de los ratones pertenecientes al grupo no colítico, control colítico y colítico tratado con <i>Lb. reuteri</i> INIA P572	165





## INTRODUCCIÓN

---







Existe una creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos más naturales, menos procesados y con una mayor vida útil. En las sociedades industrializadas, el conocimiento de la influencia de la alimentación sobre la salud se ha desarrollado de forma acelerada, con una preocupación creciente por el consumo de alimentos “saludables” que sirvan para mejorar nuestra calidad de vida, proporcionen beneficios para la salud o reduzcan el riesgo de sufrir enfermedades (Mintel, 2015). La producción de alimentos funcionales, así como de productos procesados, listos para el consumo, también llamados ready-to-eat (RTE), se ha incrementado considerablemente en la última década. Las exigencias laborales actuales, el estrés, la crisis global, la limitación del tiempo disponible, son algunos de los cambios en los hábitos de vida que generan como resultado estas demandas en el consumidor y que implican un importante interés comercial para la industria alimentaria (Sloan, 2015).

Figura 1. Ejemplo de productos funcionales existentes en el mercado



## 1.1. SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS

Según el informe emitido por la European Food Safety Authority (EFSA) en 2015 relativo a las zoonosis acaecidas en 2014 en 28 estados miembros de la Unión Europea (UE) y cuatro estados no miembros, se registraron 5251 brotes asociados a alimentos, incluyendo

el agua. La mayor parte fueron causados por virus (20,4%), *Salmonella* (20,0%), toxinas bacterianas (16,1%) y *Campylobacter* (8,5%), mientras que en un 29,2% de los brotes no se identificó el agente causante. Los huevos y productos derivados del huevo, junto con el pescado y los productos derivados de la pesca son los alimentos implicados con mayor frecuencia en estos brotes. El número de brotes en que se observó una relación directa entre los casos en humanos y el alimento que fue vehículo del patógeno fue de 592.

En la UE la toxiinfección alimentaria más frecuente es la campilobacteriosis. El número de casos por *Campylobacter* aumentó respecto a 2013 un 10%, así como el número de casos de salmonelosis, aunque los brotes asociados a este patógeno han disminuido desde 2008 un 44%. El número de casos de listeriosis ha ido aumentando desde 2009, y en concreto un 16% respecto a 2013, a pesar de que raramente se encuentra *Listeria monocytogenes* en concentraciones superiores al límite legal establecido en los productos RTE. Durante 2014 los casos de yersiniosis fueron similares a los registrados en 2013 y los casos por *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC) disminuyeron respecto al año anterior (EFSA, 2015).

### 1.1.1. Principales microorganismos patógenos asociados a alimentos

#### 1.1.1.1. *Campylobacter*

Este género incluye bacilos pequeños, gram negativos, termotolerantes, microaerófilos, móviles, flagelados y no esporulados. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 25 y 42 °C, su intervalo de pH entre 5-9, y no crece con una actividad de agua menor a 0,98. *Campylobacter* es un género perteneciente a la familia *Campylobacteriaceae* y se encuentra en el tracto intestinal de animales, siendo uno de los más comunes el pollo. Al menos una docena de especies de *Campylobacter* han sido implicadas en enfermedades humanas, de las que *C. jejuni* y *C. coli* son las más frecuentes (Talaro y Chess, 2015).

La campilobacteriosis es la zoonosis más común en la UE y en los Estados Unidos con una tendencia en aumento en los 5 últimos años. En 2014 en la UE fueron casi 237.000 casos declarados. Se presenta con una dosis infectiva baja y cursa en general con dolor abdominal, diarrea, vómitos y fiebre. El período de incubación es de 1 a 10 días, con una duración media de 3 a 4 días.

Los alimentos asociados a la campilobacteriosis son muy variados, pero la principal vía de transmisión alimentaria es la carne poco cocinada (sobre todo la de aves de corral), aunque la leche cruda también es otra vía principal de infección. Las frutas y verduras regadas y/o lavadas con agua contaminada también pueden ser transmisoras de la bacteria. En el ámbito doméstico destaca la transmisión por otros alimentos a causa de una contaminación cruzada (Elika, 2013; Talaro y Chess, 2015).

### 1.1.1.2. *Salmonella*

Es un bacilo gram negativo, pequeño, anaerobio facultativo, no esporulado, móvil y con gran capacidad de adaptación a ambientes adversos, como altas concentraciones de sal, valores de pH de 4,5 a 9, temperaturas entre 6-42 °C y valores de actividad de agua igual o superiores a 0,93 (D'Aoust, 2000; Holt y col., 2000). El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y actualmente se divide en 2 especies: *Salmonella enterica*, con 6 subespecies y *Salmonella bongori*, mucho menos frecuente. Cada subespecie, a su vez, se divide en serovariedades o serotipos y la mayoría pertenecen a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Existen más de 2600 salmonelas zoonóticas, aunque haya un número limitado asociado a infecciones humanas y la prevalencia de los serovares puede cambiar con el transcurso del tiempo (Elika, 2013; Talaro y Chess, 2015).

La salmonelosis humana se caracteriza por episodios de fiebre, dolor abdominal, náuseas y a veces vómitos, después de un periodo de incubación de 12-36 horas. Los síntomas pueden ser suaves y durar unos días. Sin embargo, en algunos pacientes la infección puede ser más grave, provocar deshidratación y suponer un riesgo para la vida. No obstante, menos de un 1% de los casos suele ocasionar la muerte. En 2014, en la UE (EFSA, 2015) se notificaron cerca de 89000 casos.

El reservorio común de la *Salmonella* es el tracto gastrointestinal de los animales, pudiendo contaminar numerosos alimentos tanto de origen animal como vegetal de modo directo o indirecto. La transmisión a menudo sucede cuando el microorganismo entra en el área de preparación de comida y es capaz de multiplicarse en el alimento, debido a temperaturas inadecuadas de almacenamiento, cocinado incompleto o contaminación

cruzada con productos RTE. Los alimentos más relacionados con toxiinfecciones por *Salmonella* son los huevos y carnes de cerdo o aves de corral (Tesfai y col., 2011; EFSA, 2015).

#### 1.1.1.3. *Yersinia enterocolítica*

Es una enterobacteria gram negativa no esporulada, capaz de crecer en un amplio intervalo de temperaturas desde -1 a 40 °C, y en ausencia/presencia de oxígeno. Sus cepas patógenas pueden secretar una enterotoxina, resistente al calor y a cambios de pH, que invade el intestino delgado. El género *Yersinia* está compuesto por 11 especies, de las que 4 son patógenas y 2 causan toxiinfección alimentaria: *Y. enterocolítica* y *Y. pseudotuberculosis* (Talaro y Chess, 2015).

Es la tercera bacteria causante de toxiinfecciones alimentarias según el último informe emitido por la EFSA (2015), con 6625 casos. La yersiniosis provoca gastroenteritis cursando con dolor abdominal, diarrea, vómitos y fiebre. Las bacterias se ingieren con alimentos contaminados, instalándose en el íleon, y pueden llegar a producir úlceras. Estos síntomas aparecen entre las 24 y 36 horas tras la ingestión del alimento contaminado.

Las fuentes de infección más frecuentes son la carne de cerdo y de ovino insuficientemente cocinados, la leche y derivados lácteos no pasteurizados, huevos crudos y derivados (mayonesa, salsas, cremas de pastelería, etc.) (Jay, 2005). Las verduras refrigeradas durante largos periodos de tiempo también se asocian a la yersiniosis. En platos preparados, este microorganismo puede crecer a temperatura de refrigeración en carne envasada al vacío, mariscos cocidos, etc., si estos alimentos se mantienen durante largos periodos de tiempo (Elika, 2013).

#### 1.1.1.4. *Listeria monocytogenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos, gram positivos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y flagelados. Son capaces de crecer en un amplio intervalo de pH (4,3-9,8) y temperatura (0,5-45 °C) y sobrevivir en condiciones salinas elevadas (20%) y baja actividad de agua (0,91) (Warriner y Namvar, 2009). Este

género está formado por 17 especies y dos subespecies (Weller y col., 2015), siendo *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* patógenas (Rocourt y Buchrieser, 2007).

La listeriosis es una toxiinfección alimentaria con baja incidencia que afecta con mayor frecuencia a mujeres embarazadas, recién nacidos, niños, ancianos y adultos inmunodeprimidos (Rocourt y col., 2000). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad aparecen después de 2-90 días y pueden agruparse en dos categorías. La listeriosis no invasiva, que presenta fiebre y gastroenteritis, cursa en individuos sanos tras consumir alimentos con altas dosis de *L. monocytogenes* (>8 log ufc/g). Después del período de incubación, aparecen los síntomas gripales acompañados de dolor abdominal y diarrea (Warriner y Namvar, 2009). La listeriosis invasiva cursa con severas manifestaciones como septicemia, meningitis o encefalitis y suele afectar únicamente a los grupos de riesgo, alcanzando un porcentaje elevado de mortalidad del 20-30% (Lianou y Sofos, 2007). La dosis infectiva depende de muchas variables, entre ellas el estado de salud del huésped, la virulencia de la cepa, la concentración del patógeno y la cantidad de alimento consumido. En el último informe emitido por la EFSA, se notificaron 0,52 casos por 100000 habitantes, que representó un aumento del 30% respecto a 2013, con un total de 2161 casos y un 15% de mortalidad (210 muertes de 1401 casos confirmados). La tendencia de aumento de este patógeno continúa desde 2009. Esta toxiinfección alimentaria es la más grave en términos de tasa de hospitalización y es considerada una de las principales causas de muerte de origen alimentario en los países industrializados. Por ello, uno de los principales objetivos de las autoridades sanitarias es reducir la incidencia de listeriosis.

Desde principios de los años 80, esta bacteria ha sido considerada patógeno alimentario (Rørvik y col., 1995). Se ha aislado en suelos, en ambientes acuáticos y en el tracto digestivo de animales y humanos sanos. Un 99% de los casos de esta zoonosis se atribuyen al consumo de alimentos contaminados (Scallan y col., 2011), siendo los alimentos RTE los implicados con mayor frecuencia (FAO/WHO, 2004). *L. monocytogenes* es capaz de crecer en una amplia variedad de alimentos, entre ellos, productos cárnicos loncheados, pescado ahumado, leche y productos lácteos, vegetales, salchichas y paté (Talaro y Chess, 2015).

#### 1.1.1.5. *Escherichia coli*

La especie *E. coli* incluye bacilos gram negativos, móviles, con flagelos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que pueden presentar cápsula, muy resistentes a la temperatura y a los agentes externos. Pueden crecer a pH entre 4,4 y 10, temperaturas entre 8 y 46 °C, concentraciones de sal de hasta un 6% y en medios con valores mínimos de actividad de agua de 0,95. En la literatura científica se han descrito distintas cepas patógenas de *E. coli*: verocitotoxigénica o productora de toxina Shiga (VTEC/STEC), enteropatogénica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), adherente-invasiva (AIEC), enteroagregativa (EAEC), atacante y eliminativa (AEEC) y patógena extraintestinal (ExPEC) (Blanco, 1993; Blanco y col., 2004; Rasko y col., 2008; Martínez-Medina y col., 2009; Horcajo y col., 2012).

En 2014 se registraron por la EFSA 5955 casos de infección por VTEC, un 1,9 % menos que en 2013 y tuvo un 0,2 % de casos fatales (7 muertes de 3491 casos confirmados). En 2011 hubo un brote en Alemania causado por el serotipo enterohemorrágico *E. coli* O104:H4 con más de 1700 afectados, incluyendo 32 fallecidos (Rasko y col., 2011). En los adultos sanos, los síntomas suelen ser diarrea grave, a menudo sanguinolenta, acompañada de cólicos abdominales, sin fiebre o con fiebre moderada, que suelen aparecer dos o tres días después del consumo del alimento contaminado.

Son microorganismos ubicuos, muy resistentes a las condiciones medio ambientales. Las cepas de *E. coli* no patógenas forman parte de la microbiota intestinal de mamíferos, pudiendo así contaminar agua, suelo, alimentos y vegetales, y siendo por tanto un indicador de contaminación fecal. A pesar de la dificultad de cálculo de la dosis infectiva, la bibliografía consultada muestra que es dependiente de cepa, siendo baja para EVEC y EHEC (10-10<sup>2</sup> células) (Nataro y Kaper, 1998; Schmid-Hempel y Frank, 2007) y elevada para ETEC y EIEC (DuPont y col., 1971; Nataro y Kaper, 1998). Sus principales reservorios son vacuno, ovino, porcino y aves, en los que puede actuar como comensal no patógeno. Muchas de las intoxicaciones debidas a este microorganismo se deben principalmente a la ingestión de carne y productos cárnicos de vacuno (hamburguesas, carne picada, etc.) poco cocinados, así como de leche cruda y de productos elaborados con ella (queso, nata, etc.), ingestión de



agua y también podría darse en frutas o verduras lavadas o regadas con agua contaminada (Doyle y col., 1997; Ferrer y Simón, 2002; Talaro y Chess, 2015).

### 1.1.2. Estrategias de conservación de alimentos alternativas a los tratamientos térmicos

La inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública no solo por la repercusión de las enfermedades de transmisión alimentaria, sino también por las consecuencias económicas asociadas (FAO, 1997). Según el Instituto de Medicina Americano (2009) los patógenos de las zoonosis han causado más del 65% de las enfermedades e infecciones emergentes en las últimas seis décadas. El coste directo de estas zoonosis se estimó en la última década en más de 20 billones de dólares con 200 billones de dólares en pérdidas indirectas que afectaron a la economía mundial (World Bank, 2010).

Entre las estrategias de conservación de alimentos, la temperatura es el factor ambiental que se puede regular más fácilmente para controlar la carga microbiana. Las altas temperaturas son letales para la mayoría de los microorganismos. Las bajas temperaturas retardan considerablemente el metabolismo, disminuyendo el riesgo de multiplicación de microorganismos. Como alternativa a los tratamientos térmicos existen otras propuestas, entre los que se encuentran las estrategias de bioconservación y las tecnologías no térmicas, como las altas presiones hidrostáticas, que se desarrollan a continuación.

Las tecnologías no térmicas, alternativas y/o complementarias a los tratamientos de conservación tradicionales surgen de la demanda creciente de alimentos mínimamente procesados por los consumidores. Estas nuevas tecnologías son en general técnicas suaves, poco agresivas, que tratan de ofrecer productos muy semejantes a los frescos (Herrero y Romero de Ávila, 2006; Aymerich y col., 2008).

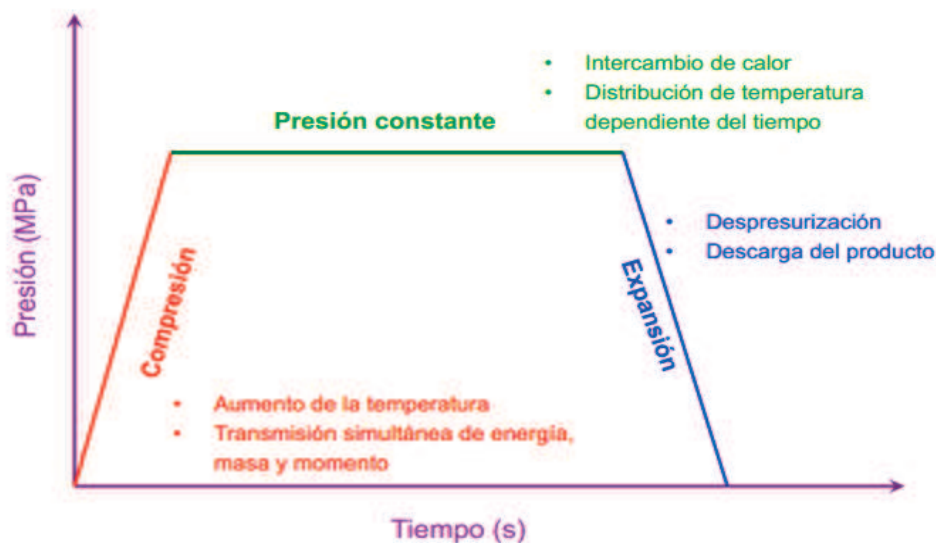
#### 1.1.2.1. Tecnologías no térmicas

##### 1.1.2.1.1. Altas presiones hidrostáticas (APH)

La tecnología de las altas presiones consiste en la aplicación de presiones que se sitúan en el intervalo de 300 a 700 MPa (Ordóñez y col., 2004). En los tratamientos de APH el

fluido transmisor es el agua, aunque también pueden emplearse soluciones de benzoato sódico o propilenglicol (Yaldagard y col., 2008). Los fundamentos de las altas presiones están apoyados en dos principios físico-químicos (San Martín y col., 2002; Yuste y col., 2001). En primer lugar la ley de Pascal, que indica que el incremento de presión aplicado a la superficie de un alimento se transmite de una manera uniforme y casi instantánea a cada una de las partes del mismo, independientemente del tamaño, evitando así tanto la presencia de zonas sobretratadas como la deformación del producto, es la llamada presión isostática. En segundo lugar el principio de Le Chatelier, que establece que los fenómenos acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Todos los puntos del alimento son sometidos a la misma presión en el mismo momento y por lo tanto, el tamaño no es un factor limitante en la producción (Patterson, 2005), como ocurre en los tratamientos térmicos (San Martín y col., 2002), reduciéndose así el tiempo de procesado.

Figura 2. Etapas del proceso de presurización



Las primeras investigaciones sobre la aplicación de esta tecnología en la conservación de alimentos comenzaron hace más de 100 años. Hite (1899) utilizó este tratamiento para la conservación de la leche y en 1914 para la conservación de zumos y carne, sin embargo hasta la década de los 90 no se empezaron a comercializar alimentos presurizados (Lakshmanan y Daalgard, 2004). Este interés ha aumentado por los resultados de numerosos



estudios científicos que reconocen el mercado del procesado con APH (Hendrickx y col., 2005).

### 1.1.2.1.1.1. Efecto de las altas presiones sobre los microorganismos

Existen numerosos trabajos que estudian la respuesta de los microorganismos a la alta presión. Distintas variables externas como son la intensidad de la presión, el tiempo de aplicación del tratamiento o la temperatura, ejercen un efecto directo sobre la supervivencia de los microorganismos. En general, se asume que cuanto mayor sea la presión, el tiempo de mantenimiento y la temperatura, mayor será el efecto sobre los microorganismos y más alterado resultará el producto en sus cualidades organolépticas y nutricionales. Sin embargo, esto tiene un límite por encima del cual no se incrementa necesariamente el efecto letal de las altas presiones sobre los microorganismos (Huang y col., 2006; Morales y col., 2008, 2009).

Las variables intrínsecas que influyen en el efecto de esta tecnología son el tipo de microorganismo, siendo los mohos y las levaduras muy sensibles, inactivándose a presiones de 200-300 MPa, mientras que las esporas resisten más de 1000 MPa (Alpas y col., 1999; Mañas y Mackey, 2004; Aymerich y col., 2008). Los microorganismos gram negativos son más sensibles que los gram positivos, debido a su membrana más robusta. La morfología celular también influye, siendo los bacilos más sensibles a la presurización que los cocos. En cuanto al estado fisiológico, los microorganismos en fase exponencial son más sensibles a las altas presiones que los que se encuentran en fase estacionaria (Mañas y Mackey, 2004). Otro factor intrínseco es la cepa, ya que existe variabilidad entre cepas de la misma especie con importantes diferencias de barorresistencia (Alpas y col., 1999; Yuste y col., 2001).

El efecto del tratamiento en la inactivación microbiana incluye varios aspectos como son:

- Cambios en la morfología de las células
- Coagulación de proteínas citoplasmáticas
- Inhibición e inactivación de algunas enzimas

- Modificación de la permeabilidad celular: cristalización de los lípidos de membrana, formación de poros, liberación de componentes intracelulares, inactivación de ATPasas de membrana, descenso del pH citoplasmático
- Daño celular

Los microorganismos dañados después del tratamiento pueden recuperarse durante el resto del periodo de conservación. Este daño subletal en la membrana puede ser favorable a la hora de aplicar tratamientos combinados y conseguir así una mayor efectividad.

Figura 3. Máquina de altas presiones de Hiperbaric



#### 1.1.2.1.1.2. Efecto de las altas presiones sobre los alimentos

El efecto que las altas presiones ejercen sobre los alimentos también resulta afectado por factores como la duración e intensidad del tratamiento, la temperatura, así como por las características propias del alimento. La influencia de las APH sobre los enlaces moleculares es la siguiente:

- Ruptura de enlaces iónicos y algunos hidrofóbicos
- Estabilización de enlaces por puentes de hidrógeno
- No afectan a los enlaces covalentes

Como consecuencia de estos cambios, en alimentos tratados por APH las moléculas pequeñas como los aminoácidos, vitaminas o pigmentos no resultan prácticamente afectadas. Muchas de estas moléculas son responsables de la calidad sensorial y nutricional de los alimentos. Por el contrario, puede producirse una modificación de la estructura

tridimensional de moléculas más complejas como son las proteínas o el almidón (Yuste y col., 2001; Butz y Tauscher, 2002; Patterson, 2005).

### 1.1.2.1.2. Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)

Los PEAV consisten en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (10-50 kV/cm) y corta duración (1-100  $\mu$ s) a un material colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas y col., 1998). Se ajusta teniendo en cuenta diversos factores del alimento y la posible microbiota contaminante. Estos tratamientos provocan un fenómeno denominado electroporación que consiste en la permeabilización transitoria o permanente de la membrana citoplasmática tanto de células eucariotas como procariotas, destruyendo así a microorganismos patógenos y alterantes. Se aplica principalmente a fluidos viscosos (como zumos, papillas de frutas y verduras), pero el producto requiere conservación en refrigeración y el coste es elevado (Monfort, 2012).

### 1.1.2.1.3. Radiaciones ionizantes

Consisten en exponer al alimento durante un corto periodo de tiempo a una fuente de alta energía radiante (rayos gamma, rayos X o electrones acelerados). Estos tratamientos provocan la pérdida de los electrones más externos de los átomos, convirtiéndolos en iones. Las radiaciones ionizantes permiten destruir microorganismos patógenos y alterantes, ya que tienen acción directa sobre el ADN y ARN, y provocan desnaturalización de enzimas y alteración de membranas celulares (Durante, 2002; Morehouse, 2002; Chung y col., 2007). La WHO (1999) establece una clasificación en función de la energía aplicada, siendo baja (<1 kGy) la utilizada para demorar procesos como germinación o maduración de frutas y verduras, media la encargada de reducir la carga de patógenos y alterantes, y alta (10-50 kGy) la empleada para esterilizar carnes, pescados o especias. El uso de electrones acelerados requiere una dosis baja de irradiación en su aplicación en alimentos frente a patógenos. En salmón ahumado sólo se necesitaron 1,5 kGy para alcanzar el objetivo de seguridad alimentaria (FSO, del inglés Food Safety Objective) de *L. monocytogenes* en la UE y EEUU (Medina y col., 2009) y <2,0 kGy para jamón cocido (Cabeza y col., 2007).

#### 1.1.2.1.4. Envasado en atmósferas protectoras

Es un tratamiento que se aplica de la siguiente manera:

- el envasado **a vacío**, en el que se elimina el aire existente en el envase en el que se encuentra el alimento, sin que sea reemplazado por otro gas. Se emplea en productos como carnes frescas o curadas, pescados, quesos, etc.
- el envasado en **atmósfera controlada** (CAP), que implica que la composición del gas que rodea al alimento se mantiene constante a lo largo de un tiempo determinado mediante un control continuado y una renovación continua de la mezcla de gases.
- el envasado en **atmósfera modificada** (MAP) dónde por el contrario la composición de gases que rodea al alimento se ajusta al principio del almacenamiento y no se vuelve a controlar o ajustar. Mediante CAP y MAP se controlan las reacciones químicas, enzimáticas y microbianas, minimizando la degradación o alteración durante el almacenamiento del producto. Los gases más empleados son el oxígeno, dióxido de carbono y el nitrógeno.

#### 1.1.2.2. Bioconservación

La bioconservación es un sistema de conservación que explota la capacidad de microorganismos reconocidos como seguros, GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU o QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA, y/o de sus metabolitos para inhibir el desarrollo en alimentos de microorganismos alterantes y patógenos. Constituye una de las formas de conservación más antiguas que cobra relevancia al proporcionar alternativas a los aditivos.

##### 1.1.2.2.1. Cultivos bioprotectores

La utilización de bacterias ácido lácticas (BAL), supone una alternativa a conservantes químicos que puede ser empleada como una barrera adicional en la seguridad frente a microorganismos no deseables en la industria alimentaria. El empleo de BAL así como el de sus metabolitos en alimentos ha sido objeto de estudio en las últimas décadas. Estas bacterias responsables de la fermentación y maduración de muchos alimentos (lácteos,

cárnicos y vegetales), permiten el control de otros microorganismos alterantes y patógenos mediante la competencia por nutrientes, por la producción de ácidos y el correspondiente descenso del pH (ácido láctico y acético) y por la producción de diversos compuestos antimicrobianos (Työppönen y col., 2003; De Vuyst y Leroy, 2007).

### 1.1.2.2.2. Bacteriocinas

Son metabolitos de naturaleza proteica producidos ribosómicamente por algunas bacterias gram positivas y gram negativas. Presentan una gran variedad de características físico-químicas y espectros de acción antimicrobiana reducidos o amplios frente a bacterias gram positivas (Cintas y col., 2001). Son consideradas seguras al ser degradadas por las proteasas del tracto gastrointestinal. Las bacteriocinas pueden proporcionar a sus productores, inmunes a estos compuestos, una ventaja adaptativa frente a otras bacterias. Generalmente, eliminan la fuerza protónica que atraviesa las membranas bacterianas y forman pequeños poros, promoviendo la salida de metabolitos de pequeño tamaño como aminoácidos y nucleótidos interrumpiendo así los procesos de biosíntesis celulares (Drider y col., 2006). Actualmente la única bacteriocina reconocida como GRAS por la FDA es la nisina, producida por cepas de *Lactococcus lactis* y por *Streptococcus* ssp. (Russell y col., 2003). Su uso está autorizado en la industria alimentaria en más de 50 países y se incorporó a la lista de aditivos aprobados en la UE con el número E-234 (95/2/EC). Este bioconservante, que posee un espectro de actividad amplio, se utiliza en quesos de pasta blanda, conservas vegetales y carnes enlatadas para inhibir el crecimiento de bacterias que forman esporas, como *Clostridium* (Savadogo y col., 2006). Además ha demostrado tener poder antimicrobiano frente a microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* (Benkerroum y Sandine, 1988; Jung y col., 1992) y *Staphylococcus aureus* (Pranoto y col., 2005).

Las bacteriocinas pueden emplearse en los alimentos inoculando los cultivos productores de las mismas, purificadas o como extractos de cultivos bacteriocinogénicos, incorporadas en un envase activo, adicionadas en la masa del producto o pulverizadas en la superficie. Se ha demostrado su eficacia antimicrobiana en productos lácteos, cárnicos y

vegetales, tanto fermentados como no fermentados (Työppönen y col., 2003; De Vuyst y Leroy, 2007).

Las bacteriocinas de BAL se clasifican en distintos grupos según Kemperman y col. (2003):

- clase I o lantibióticos que tienen un tamaño molecular pequeño (< 10 kDa) y presentan en su composición aminoácidos poco comunes como lantionina. La nisina y la lacticina 481 son los lantibióticos más conocidos.
- clase II o no lantibióticos, de bajo peso molecular, no tienen aminoácidos atípicos y son termoestables. Se encuentran en este grupo la pediocina PA-1 o la sakacina P.
- clase III, formadas por péptidos de alto peso molecular (> 30 kDa) y termosensibles, incluyen la helveticina, caseicina y enterolisina.
- clase IV, bacteriocinas complejas formadas por péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Como ejemplo la glicoproteína lactocina S.
- clase V, bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente, como es el caso de la enterocina AS-48.

#### 1.1.2.2.3. Reuterina

La capacidad de algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* para producir un compuesto antimicrobiano de amplio espectro denominado reuterina fue descrita por Talarico y col. (1988).

La reuterina o 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) es una sustancia neutra, soluble en agua y de naturaleza aldehídica producida por *Lb. reuteri* durante el metabolismo anaeróbico del glicerol (Smiley y Sobolov, 1962; Axelsson y col., 1989; Talarico y col., 1988; Rodríguez y col., 2003; Vollenweider y col., 2010). Estudios sobre la estructura del 3-HPA revelaron que disuelto en agua se encuentra en un equilibrio compuesto por tres estructuras: monomérica, monomérica hidratada y dimérica cíclica (Sistema HPA, figura 4) (Hall y Stern, 1950; Talarico y Dobrogosz, 1989). La masa molecular de la reuterina es de 74,08

g/mol, resultado obtenido por Vollenweider y col. (2003) mediante resonancia magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$  RMN).

La reuterina es efectiva en un amplio intervalo de pH (de 2 a 8), mostrándose más estable a pH ácido, mientras que a pH 11 se degrada inmediata e irreversiblemente (Talarico y col., 1988; El-Ziney y Debevere, 1998). La concentración de reuterina es otro de los factores que influyen en su estabilidad. Según Vollenweider y col. (2003), cuando la concentración de reuterina es superior a 4,9 M la forma que predomina es el dímero. Cuando la concentración baja de 1,4 M predomina el HPA hidratado, forma que prevalece a concentraciones bajas, incluso menores de 0,03 M, que son las empleadas en la mayoría de las investigaciones en las que la reuterina se utiliza como antimicrobiano. Además del pH y la concentración de reuterina presente en el medio, la temperatura es otro factor que influye en la estabilidad del 3-HPA (Doleyres y col., 2005). La reuterina puede deshidratarse a acroleína en condiciones de temperatura elevadas, siendo mayor esta conversión cuánto mayor es el aumento en la temperatura (Schauenstein y col., 1977). Su almacenamiento a 20 °C durante 7 d en stocks de 0,9-1,4 M no genera cambios químicos en su estructura y lo mismo sucede durante 150 d a 4 °C (Vollenweider y col., 2003). Tampoco se observaron cambios en la actividad de la reuterina disuelta en agua a una concentración de 20 mM con un pH de 4,7 durante tres años a 4 °C (Lüthi-Peng y col., 2002).

La reuterina es activa frente a numerosos microorganismos patógenos y alterantes asociados a alimentos. Por sus características, se ha propuesto como bioconservante en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos (Axelsson y col., 1989; Vollenweider y col., 2003).

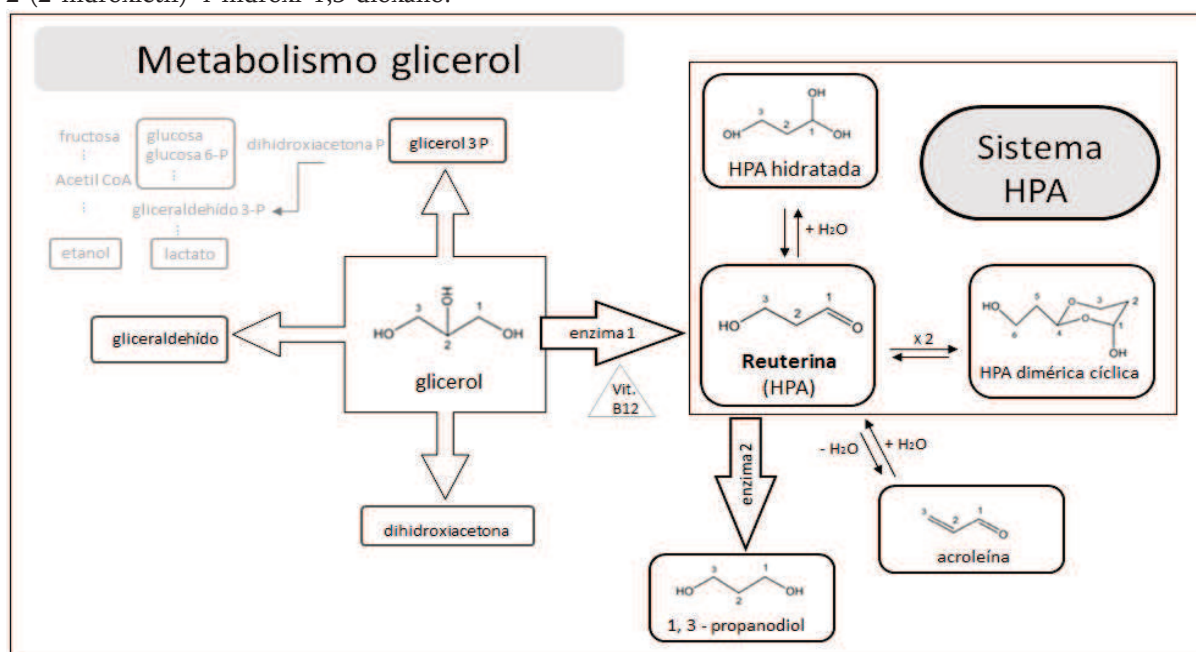
### 1.1.2.2.3.1. Producción

El 3-HPA es un metabolito intermedio en la ruta de reducción del glicerol, descrito en *Klebsiella*, *Citrobacter* (Toraya y col., 1980; Ulmer y Zeng, 2007; Sriramulu y col., 2008), *Clostridium* (Heyndricks y col., 1991) y *Lactobacillus* (Schutz y Radler, 1984, Lüthi-Peng y col., 2002) entre otros. La principal enzima responsable de la formación de 3-HPA en *Lb. reuteri* es la glicerol deshidratasa coenzima B12- dependiente (GDH), la cual ha sido



purificada y caracterizada (Talarico y Dobrogosz, 1990), y forma parte del operón *pdu*, (Morita y col., 2008). La enzima GDH cataliza la conversión del glicerol, 1,2-propanodiol y 1,2-etanodiol a 3-HPA, propanal y acetaldehído respectivamente teniendo al glicerol como sustrato preferente y la vitamina B12 como cofactor (Abeles y col., 1960; Smiley y Sobolov, 1962; Langa y col., 2015). A continuación, el 3-HPA se puede reducir a 1,3-PDO (1,3-propanediol) gracias a la 1,3-propanediol deshidrogenasa (1,3-PDH) (oxidorreductasa NAD<sup>+</sup> dependiente) (Talarico y col., 1990; Daniel y col., 1998).

**Figura 4.** Metabolismo del glicerol y del sistema HPA. Formación del 3-hidroxi-propanal, 1,3-propanediol y acroleína. → Reacción enzimática, ⇌ reacción en equilibrio; enzima 1: glicerol deshidratasa; enzima 2: 1, 3-propanediol oxidorreductasa; HPA hidratada: 1,1,3-trihidroxi-propano, HPA dimérica cíclica: 2-(2-hidroxi-etil)-4-hidroxi-1,3-dioxano.



*Lb. reuteri* puede utilizar el glicerol como aceptor de electrones, pero no como única fuente de carbono (Talarico y col., 1990). Por tanto, la acumulación de 3-HPA se ve favorecida en presencia de glicerol si no hay glucosa, o hay una cantidad pequeña (El-Ziney y col., 1998; Sauvageot y col., 2000; Lüthi-Peng y col., 2002). Cuando el suministro de NADH procedente de la glucólisis se agota, es decir en la fase estacionaria de crecimiento, *Lb. reuteri* a diferencia de otros microorganismos, continúa produciendo 3-HPA a pesar de no ser necesario desde un punto de vista bioenergético. Esta capacidad de algunas cepas de *Lb. reuteri* de acumular y secretar cantidades considerables de reuterina (Talarico y col.,



1988; Lüthi-Peng y col., 2002) puede aportar ventajas competitivas a las cepas productoras (Spinler y col., 2008). La producción de reuterina ha sido detectada de forma ocasional en lactobacilos pertenecientes a otras especies como *Lb. collinoides* (Sauvageot y col., 2000) y *Lb. coryniformis* (Martín y col., 2005).

### 1.1.2.2.3.2. Modo de acción

Se han propuesto varias hipótesis sobre posibles mecanismos de acción de la reuterina (Dobrogosz y Lindgren, 1988; Vollenweider y col., 2003; O'Brien y col., 2005).

Inicialmente se observó que la reuterina actuaría sobre la síntesis de ADN inhibiendo las enzimas sulfhidrilo implicadas en la actividad ribonucleótido reductasa (Talarico y Dobrogosz, 1989), al situarse el dímero en el lugar de reconocimiento de la ribonucleótido reductasa. Sin embargo, la inhibición observada por la tiorredoxina no podría explicarse con esta hipótesis (Talarico y Dobrogosz, 1989). Los análisis realizados mediante RMN por Vollenweider y col. (2003) contradicen este postulado, ya que en concentraciones fisiológicas el sistema 3-HPA está compuesto principalmente por monómeros. Posteriormente se atribuyó la acción antimicrobiana de la reuterina a su capacidad para reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las ribonucleótido reductasas y de las tiorredoxinas (Schauenstein y col., 1977; Sung y col., 2003; Vollenweider y col., 2003, 2004; O'Brien y col., 2005). Finalmente, se demostró que la reuterina induce estrés oxidativo en las células, modificando el grupo tiol en ensayos *in vitro*. Añadiendo cisteína (aminoácido con grupo tiol) al medio se comprobó que la reuterina sólo actúa en una concentración muy alta, mientras que adicionando valina o serina (aminoácidos sin grupo tiol) el aldehído demuestra su actividad antimicrobiana desde bajas concentraciones (Schaefer y col., 2010).

### 1.1.2.2.3.3. Aplicación como bioconservante

La acción antimicrobiana de la reuterina en alimentos frente a microorganismos patógenos y alterantes de interés en la industria alimentaria ha sido demostrada en diversos estudios. La reuterina resulta más eficaz frente a gram negativos como *E. coli*, *Yersinia*, o

*Salmonella* que frente a gram positivos como *Staphylococcus* o *Listeria* (Arqués y col., 2008a, b; Montiel y col., 2015a). Además debido a sus características, la reuterina presenta un alto potencial como conservante alimentario de amplio espectro. Las BAL son más resistentes a la acción de la reuterina, siendo necesarias concentraciones 3 a 5 veces mayores para su inactivación (Axelsson y col., 1989; El-Ziney y col., 1998). El aumento de la temperatura (10-30 °C) incrementa el efecto antimicrobiano de la reuterina, mientras que el pH (4,5-6,5) y la concentración de sal (0,5-3%) no interaccionan con el efecto de la reuterina en caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con glucosa y extracto de levadura (Rasch y col., 2002). De acuerdo con su composición química, la reuterina es resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas (Axelsson y col., 1989).

*Lb. reuteri* se aísla frecuentemente del intestino de humanos (Mishra y col., 2012), de animales como cerdos y pollos, así como de diferentes alimentos, como embutidos, leche y queso (Sarraf y col., 1985; El-Ziney y col., 1998; Rodríguez y col., 2003).

La actividad antimicrobiana frente a gram positivos y gram negativos en leche y productos lácteos ha sido descrita en distintos trabajos (El-Ziney y Debevere, 1998; Arqués y col., 2004; Arqués y col., 2008a, b; Arqués y col., 2011). La adición de reuterina liofilizada (50, 100 y 150 UA/g) en leche y queso Cottage almacenado a 7 °C tuvo un efecto inhibitorio frente a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, aumentando al incrementar la concentración. En leche, la grasa (del 0,5 al 3%) no afecta a su actividad antimicrobiana, que resulta favorecida con el incremento de concentración de sal hasta el 3% frente a *L. monocytogenes* (El-Ziney y Debevere, 1998). El efecto bactericida de la reuterina se ha comprobado también frente a *C. jejuni*, *Y. enterocolitica* y *Aeromonas hydrophila* tras el almacenamiento de la leche a 4 °C, así como frente a *E. coli* O157: H7 y *S. Enterica* a 8 °C (Arqués y col., 2008a). Mediante la combinación de la reuterina, nisina y el sistema lactoperoxidasa (SLP) se ha observado una actividad antimicrobiana sinérgica en leche frente a gram negativos (Arqués y col., 2008a) y frente a gram positivos en cuajada aunque con un efecto menos marcado (Arqués y col., 2008b). La actividad de este compuesto antimicrobiano también se ha estudiado en productos cárnicos, donde se registró un efecto bactericida frente a *L.*

*monocytogenes* y *E. coli* en carne de cerdo, que aumentaba al añadir ácido láctico (5%), sin detectarse alteraciones en pH, color o textura del alimento (El-Ziney y col., 1999).

La aplicación de la reuterina como bioconservante en la industria alimentaria podría realizarse mediante la adición del compuesto purificado o bien mediante la suplementación en el alimento de una cepa productora y glicerol.

### 1.1.2.2.4. Sistema lactoperoxidasa (SLP)

El sistema lactoperoxidasa se compone de la enzima lactoperoxidasa, que cataliza la reacción de oxidación del ión tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) por el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generando compuestos intermediarios transitorios fuertemente oxidantes como hipotiocianito ( $\text{OSCN}^-$ ) e hipotiocianoso ( $\text{HOSCN}$ ). Estos compuestos oxidan los grupos sulfhidrilo constituyentes de la membrana citoplasmática e inhiben enzimas clave en el metabolismo celular, interfiriendo en el transporte de nutrientes, la síntesis de ADN y ARN y la cadena respiratoria (Naidu, 2000). Las células de los mamíferos no resultan afectadas por los productos de oxidación del tiocianato, por lo que el SLP no es tóxico, sino que también protege frente a los efectos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Reiter y Härnult, 1984). La enzima lactoperoxidasa es una glicoproteína de aproximadamente 78 kDa de peso molecular que contiene un grupo hemo (protoporfirina IX), pertenece al grupo de las peroxidasas y protege a las células del metabolismo tóxico del oxígeno.

El SLP forma parte de los mecanismos de defensa de la inmunidad innata en humanos y está presente en leche así como en fluidos biológicos como son las lágrimas, la saliva y el semen. El SLP es eficaz frente a bacterias, hongos y virus. En el año 2002, la Autoridad Alimentaria de Australia y Nueva Zelanda elaboró un informe sobre el uso de la lactoperoxidasa y del  $\text{NaSCNO/KSCNO}$  (FSANZ, 2002) en la superficie de la carne, con el objeto de reducir las poblaciones microbianas presentes. En dicho documento se mencionan también el pescado, la leche y sus productos derivados como posibles alimentos donde aplicar este sistema antimicrobiano (Montiel, 2010).

El efecto bactericida del SLP frente a patógenos gram positivos como *L. monocytogenes* y *S. aureus* se ha comprobado en leche y productos lácteos (Zapico y col.,

1998; García-Graells y col., 2000; Gay y Amgar, 2005; Arqués y col., 2008a), jamón curado (De Alba y col., 2012b; Bravo y col., 2014; Montiel y col., 2015a), carne de ternera fresca (Kennedy y col., 2000; Elliot y col., 2004) y salmón ahumado (Montiel y col., 2014c). Su actividad antimicrobiana también se ha investigado frente a gram negativos como *A. hydrophila*, *E. coli*, *S. Enterica*, *C. jejuni* en leche refrigerada y frente a *E. coli* y *S. Enterica* en carpaccio de ternera y jamón curado (De Alba y col., 2012a, b; Bravo y col., 2014), en jamón cocido y en salmón ahumado (Montiel y col., 2014c y 2015a, b).

#### 1.1.2.2.5. Lactoferrina (LF)

Es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa de peso molecular que pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas. Fue aislada e identificada por primera vez de leche bovina (Sørensen y Sørensen, 1939) y posteriormente de leche humana (Johanson, 1960). Se considera que su función fisiológica es el transporte de hierro, formando además parte del sistema inmune innato. Está organizada en una estructura bilobular con capacidad para unir un átomo de hierro a cada uno de los lóbulos, a la vez que une un ión carbonato (Baker, 1994). Posee una alta afinidad por el hierro, siendo capaz de quelar hierro II y III de forma reversible, impidiendo el uso del mismo por los microorganismos y limitando su capacidad para multiplicarse. La capacidad de unir hierro, incluso a pH ácido es importante, especialmente en los sitios de infección e inflamación, donde debido al metabolismo bacteriano, el pH puede descender hasta 4,5, previniendo así su uso por parte de los microorganismos y evitando su proliferación (Valenti y Antonini, 2005). La LF es sintetizada y secretada por las células epiteliales de mucosas en diversas localizaciones (Mason y Taylor, 1978), y está presente en todos los mamíferos. Es en calostro y en leche donde aparece en mayor concentración, aunque también aparece en el interior de los gránulos secundarios de neutrófilos y linfocitos, liberándose así al plasma sanguíneo.

Además de las funciones atribuidas como posible mediador en la absorción y transporte de hierro a nivel intestinal (Suzuki y col., 2005) se le atribuye un potente efecto antimicrobiano, microbiostático y microbicida frente a virus, bacterias, mohos, levaduras y

protozoos, afectando a su capacidad de crecimiento y proliferación (Jenssen y Hancock, 2009). El efecto bacteriostático de la LF parece estar relacionado con su capacidad de secuestrar hierro, mientras que su actividad bactericida parece debida a su unión con los componentes de la pared celular o alteración de los mismos, tales como moléculas de lipopolisacáridos en bacterias gram negativas y ácidos teicoicos o lipoteicoicos en gram positivas. Como consecuencia, se produce despolarización, pérdida de la integridad de la membrana y del gradiente de pH (Vorland y col., 1999).

La lactoferrina bovina (bLF) está reconocida actualmente en EEUU como GRAS por la FDA y está permitido su uso pulverizada sobre las canales y piezas cárnicas con fines antimicrobianos, siempre que no se superen las concentraciones estipuladas para cada tipo de alimento, se etiqueten debidamente y sean sometidos a los procesos o tratamientos habituales de la carne, como lavado con agua o con ácido láctico (Taylor y col., 2004). En Japón está incluida en la “Lista de aditivos alimentarios” y considerada como “aditivo natural permitido”. En la UE la bLF está considerada como un “nuevo ingrediente alimentario” sometido a la “Nueva Regulación de Alimentos” (EC nº 258/97), con sus límites máximos establecidos, y debiéndose etiquetar su presencia y origen (Del Olmo, 2012). Sin embargo, hay estudios que señalan que añadida en alimentos (0,1%) como salmón ahumado o jamón cocido resulta poco eficaz frente a microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 o *S. Enterica* (Montiel y col., 2014b y 2015a).

### 1.1.2.2.6. Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto volátil, de masa molecular 86 g/mol, responsable del olor a mantequilla. Se produce durante la maduración del queso y la producción de yogur por diferentes BAL como *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, así como por otros microorganismos a través de la fermentación del citrato (Hugenholtz, 1993).

Se emplea en la industria alimentaria como aromatizante en productos lácteos, bollería, palomitas, etc., y es considerado GRAS por la FDA (Jay, 1982). También puede encontrarse de manera natural en alimentos fermentados como vino tinto, café tostado,

cerveza o ensilados. La actividad antimicrobiana *in vitro* del diacetilo se comenzó a estudiar hace décadas (Kulshrestha y col., 1974; Lanciotti y col., 2003; O'Bryan y col., 2009) en leche (Hargrove y col., 1967; Gupta y col., 1973) o en carne (Kang y col., 1999) frente a distintos patógenos alimentarios como *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* y *S. aureus*. En estas investigaciones comprobó que el diacetilo es más eficaz frente a gram negativos, levaduras y mohos que frente a gram positivos (Jay, 1982). Su bajo peso molecular además de su poder hidrofílico le confieren un valor potencial como agente preventivo de la contaminación bacteriana en alimentos.

#### 1.1.2.3. Tratamientos combinados de inactivación de patógenos

La estabilidad y seguridad microbiana de los alimentos se basa en la combinación de varios factores (obstáculos) que no deberían de ser vencidos por los microorganismos. Esto es ilustrado por el llamado “efecto barrera” que es de fundamental importancia para la conservación de alimentos dado que estas barreras controlan los procesos de deterioro, intoxicación y fermentación no deseados. La tecnología de barreras engloba una combinación de obstáculos que aseguran la estabilidad y la seguridad microbiana, así como las propiedades nutritivas de un alimento. Existen diversidad de barreras para mantener la calidad y seguridad de los alimentos como son las altas y bajas temperaturas, la  $a_w$ , la acidez, el potencial redox, la presencia de microorganismos competitivos, conservantes (nisina, sulfatos), etc. Las células dañadas subletalmente por diferentes condiciones de estrés, pueden llegar a ser sensibles a diversos agentes físicos y químicos, a los cuales bajo condiciones normales presentan resistencia.

El uso de distintos tratamientos inhibitorios combinados para conseguir un efecto antimicrobiano sinérgico puede dar lugar a alimentos menos procesados pero más eficientemente conservados. En la práctica, es preferible el uso de diferentes conservantes en pequeñas cantidades que usar uno sólo en mayor cantidad (Leistner, 1995). Esta tecnología avanza cada día en su aplicación para el diseño de alimentos con varios objetivos de acuerdo a cada necesidad en las distintas etapas de la cadena de distribución, como una

medida de soporte en los productos mínimamente procesados de corta caducidad para disminuir riesgos y/o aumentar su vida útil (Alzamora y col., 1998).

El procesado con altas presiones puede aplicarse en alimentos sólidos y líquidos, y son particularmente buenos candidatos los alimentos con pH ácido. Por el contrario, en productos de baja acidez puede emplearse para alargar la vida útil en refrigeración y disminuir el riesgo de desarrollo de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*, pero no permite asegurar la completa destrucción de esporas si no se aplica alta temperatura. Una alternativa para estos productos de baja acidez sería el empleo de las APH combinado con temperatura o incluso un tratamiento térmico anterior a las APH, aunque obviamente esto podría repercutir en las características organolépticas o aspecto del producto (Rovere, 1995). Por otro lado, los valores ácidos de pH aumentan la sensibilidad de los microorganismos a la presión (Smelt, 1998), mientras que valores bajos de  $a_w$  tienen un efecto controvertido ya que por sí mismos pueden inhibir el crecimiento microbiano, pero en el tratamiento combinado con APH aumenta la resistencia a la presión de los microorganismos (Ordóñez y col., 2004). Además, se considera que medios complejos y ricos en nutrientes incrementan también la resistencia microbiana a las altas presiones (Hoover y col., 1989).

Un tratamiento combinado que ha dado lugar a buenos resultados en la inactivación de patógenos en alimentos es la aplicación de APH junto con otras estrategias de conservación. Se ha demostrado el efecto sinérgico de las APH y distintas bacteriocinas frente a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso (Arqués y col., 2008a, b; Rodríguez y col., 2005). También, la combinación del SLP y la reuterina en cuajada aumentó la inhibición de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Arqués y col., 2008a). En salmón ahumado un tratamiento con APH a 450 MPa durante 10 min y el SLP frente a *L. monocytogenes* tuvo un efecto antimicrobiano sinérgico evitando también la formación de aminas biógenas (Montiel y col., 2012). La combinación de APH con nisina y sales de lactato inhibieron el crecimiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en jamón cocido loncheado, observando que las células microbianas que habían sido dañadas subletalmente con la presurización resultaban sensibles a la nisina (Aymerich y col., 2008). Por otro lado, Garriga y col. (2002) estudiaron el comportamiento de varios patógenos inoculados en jamón cocido al que

añadieron distintas bacteriocinas (enterocinas A y B, sakacina K, pediocina AcH y nisina) y presiones de 400 MPa durante 10 min. Observaron reducciones superiores a 6 unidades logarítmicas de *E. coli* en las muestras presurizadas combinadas con nisina y estos tratamientos mantuvieron a las BAL por debajo del límite de detección. La combinación de las APH con el resto de bacteriocinas mantuvo a *L. monocytogenes* por debajo del límite de detección y los niveles de *Salmonella* observados después de la presurización permanecieron sin cambios durante el almacenamiento. El uso combinado de estos péptidos antimicrobianos con la presurización permite sensibilizar a las bacterias gram negativas (Kalchayanand y col., 2004) al tratamiento de APH.

## 1.2. ALIMENTOS FUNCIONALES: PROBIÓTICOS

Los alimentos funcionales pueden contener distintos componentes que confieren efectos beneficiosos para la salud del consumidor. Entre ellos destacan: péptidos bioactivos, elementos minerales, lípidos y componentes liposolubles, prebióticos y microorganismos probióticos.

**Péptidos bioactivos**, son péptidos que pueden liberarse mediante la hidrólisis *in vivo* o *in vitro* y ejercer distintas funciones en el organismo. Entre ellos se encuentran los péptidos antihipertensivos, antioxidantes, inmunomodulantes o antimicrobianos.

**Elementos minerales**, como puede ser el calcio de la leche, que es mucho más biodisponible que el procedente de los vegetales. Existen actualmente distintas variedades de leche enriquecida en dicho micronutriente.

**Lípidos y componentes liposolubles**, existen múltiples estudios científicos avalados por ensayos clínicos sobre los efectos beneficiosos que ácidos grasos como el  $\omega$ -3, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) ejercen sobre la protección de enfermedades cardiovasculares. En el mercado podemos encontrar leche, galletas, huevos, zumos, etc. enriquecidos con  $\omega$ -3.

**Prebióticos**, son sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que atraviesan el intestino delgado y



alcanzan el intestino grueso donde nutren a grupos seleccionados de microorganismos favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas (WGO, 2011).

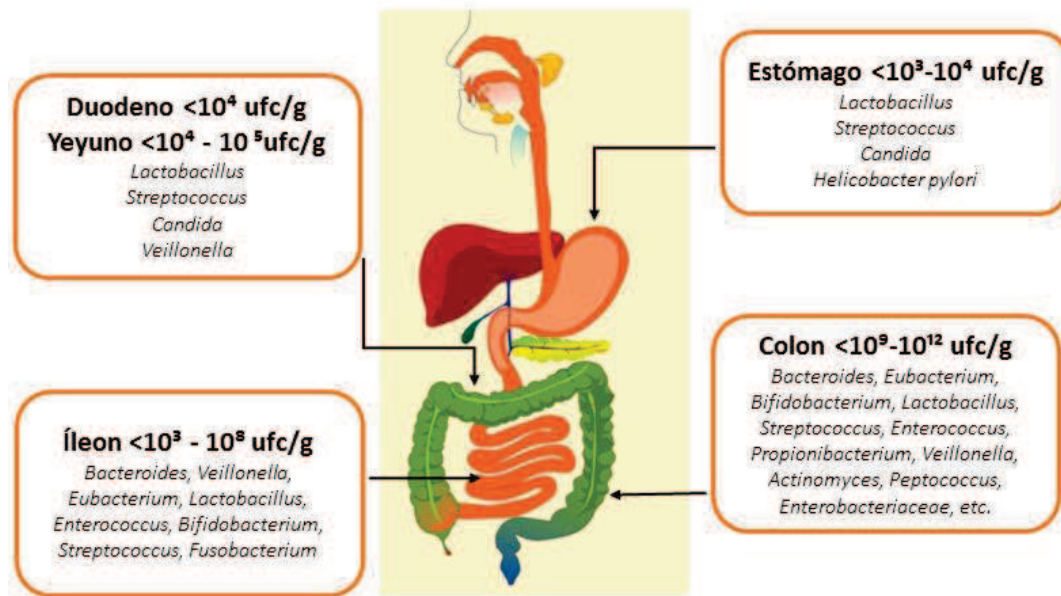
**Probióticos:** son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas confieren al huésped un beneficio para la salud (FAO/WHO, 2002). Se pueden encontrar en el mercado productos probióticos comercializados en diversos formatos con distintas especies y cepas.

### 1.2.1. Microbiota intestinal

Los primeros estudios sobre nuestra microbiota fueron realizados a finales del siglo XIX. En 1880, Theodor Escherich estudió la microbiota de las heces y su relación con la digestión, y en 1892 Albert Döderlein descubrió los lactobacilos vaginales (Suárez, 2015). La microbiota intestinal se define como el conjunto de comunidades de microorganismos vivos que colonizan el intestino, pudiéndose considerar un órgano más integrado en la fisiología del individuo (Bäckhed y col., 2005). En la actualidad sabemos que dentro de los muchos factores implicados en el aumento de determinadas enfermedades, el estilo de vida es sin duda uno de los que más impacto produce por cambios en los hábitos alimenticios. Si la ingesta no es adecuada, la nutrición será incompleta y la microbiota intestinal se verá alterada (Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001; Amores y col., 2004). Sin embargo no sólo es importante la calidad de los nutrientes que ingerimos, sino también, y sobre todo, la capacidad que tenga nuestro organismos de incorporarlos o asimilarlos, lo que dependerá muy directamente, en primer término, de la idoneidad de nuestra microbiota intestinal.

Se sabe que convivimos con más de 500 especies de microorganismos distintos en nuestro tracto gastrointestinal, y que en su conjunto contribuyen a mantener el equilibrio en el sistema (Pérez, 2015). La parte superior del tracto gastrointestinal contiene relativamente pocos microorganismos ( $10^3$  ufc/g), y el número se va incrementando a medida que se avanza distalmente, ubicándose el número máximo a nivel del colon, donde residen aproximadamente  $10^{14}$  ( $10^{11}$  ufc por gramo de contenido intestinal) (Aureli y col., 2011; Prados-Bo y col., 2015) (Fig. 5).

Figura 5. Microorganismos que se encuentran en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal



Según la teoría que describió Tissier (1900) sobre la adquisición de la microbiota intestinal infantil, que se ha venido aceptando hasta hace poco más de una década (Escalante, 2001), el feto es estéril *in utero*, entendiendo que era después del nacimiento cuándo las bacterias entraban a través de la boca y la nariz como consecuencia del contacto con la microbiota vaginal e intestinal de la madre. Sin embargo y tras varios estudios realizados en los últimos años, se ha descubierto que esa teoría no era del todo cierta. Algunos estudios realizados con neonatos sanos sin signos de infección ni inflamación, han detectado bacterias en el tejido de la placenta (Aagard y col., 2014; Stout y col., 2013), en sangre del cordón umbilical (Jiménez y col., 2005), en el líquido amniótico (Bearfield y col., 2002) y en las membranas del feto (Steel y col., 2005). El intestino del recién nacido presenta una atmósfera aerobia, por lo que los primeros microorganismos en colonizarlo son aerobios tales como *E. coli* y *Enterococcus* spp. Durante el primer día de vida, y conforme el bebé es alimentado, el oxígeno intestinal disminuye y *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (microaerófilo y anaerobio estricto, respectivamente) comienzan a proliferar en condiciones dominantes. Cuando el niño finaliza la alimentación materna, la microbiota cambia progresivamente hacia una composición parecida a los adultos, siendo a los dos años cuándo la composición y metabolismo de la microbiota intestinal de un niño se asemeja a la de un

adulto (Aureli y col., 2011; Clemente y col., 2012). Es interesante resaltar que si bien hay modificaciones transitorias derivadas del uso de antibióticos o de tipo dietético, éstas suelen ser reversibles, de modo que cada individuo mantiene una microbiota predominante relativamente estable durante toda su vida (Dethlefsen y col., 2008). Posteriormente, durante el envejecimiento, se pueden ver cambios importantes.

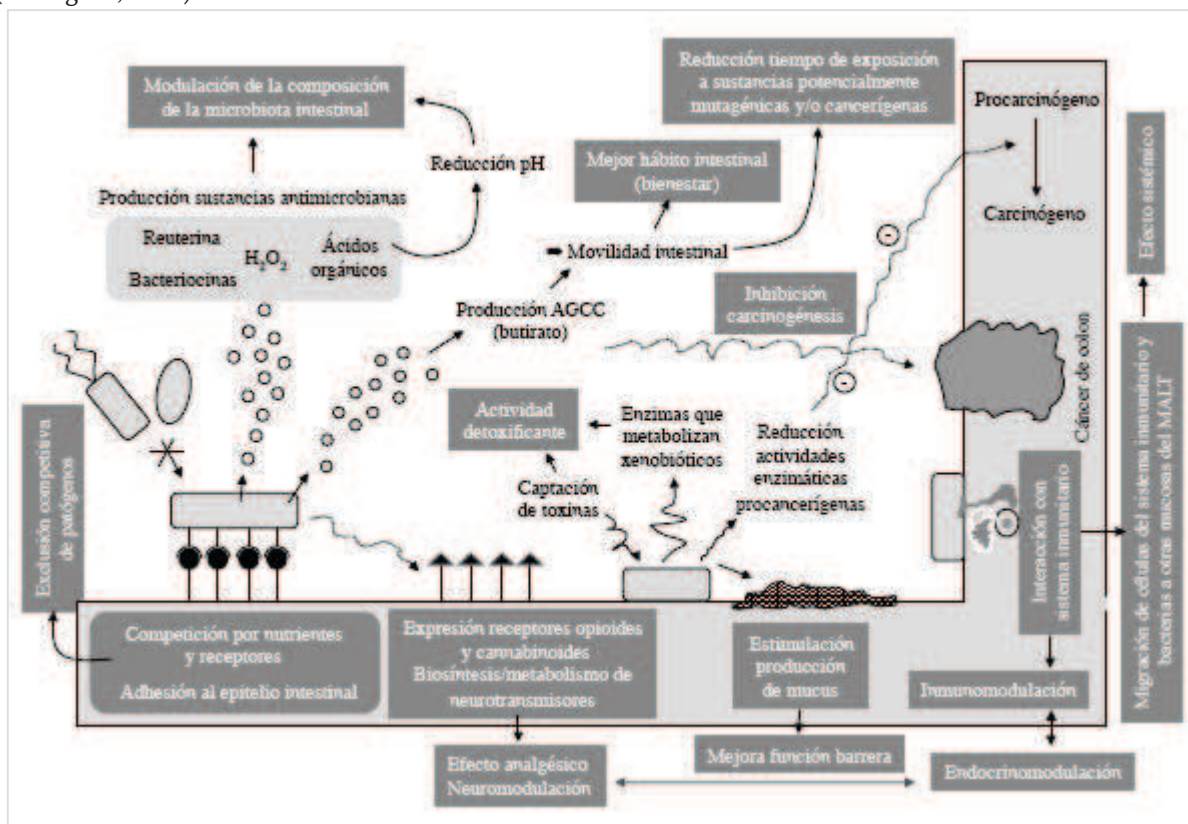
Existe una relación simbiótica entre la microbiota intestinal y el individuo. Así, en el lumen intestinal, las bacterias se benefician de un constante flujo de nutrientes, de una temperatura estable y un buen nicho dónde desarrollarse. El hospedador, de igual manera, se beneficia de las bacterias por su capacidad de sintetizar vitamina K, obtener energía de los nutrientes no absorbidos en forma de ácidos grasos de cadena corta, inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos y mantener la integridad y funcionalidad de la mucosa (Aureli y col., 2011; Rodríguez, 2015). De hecho, hay estudios en animales libres de gérmenes que revelan que la ausencia total de microbiota intestinal provoca alteraciones significativas en la estructura y función intestinal, como son una reducción del número de vellosidades y desarrollo de criptas profundas, junto con un bajo recuento de leucocitos (Szentkuti y col., 1990), etc. El incremento de la defensa no inmunitaria de la barrera intestinal consiste en el aumento de la permeabilidad intestinal y la estabilización de la microbiota (Salminen y col., 1998; Isolauri y col., 2001; Clemente y col., 2012).

### 1.2.2. Probióticos

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y se utiliza para designar aquellas bacterias que tienen efectos beneficiosos para la salud. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Elie Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado. Este científico fue el primero en relacionar la longevidad en los habitantes del Cáucaso con el consumo de productos lácteos fermentados que contenían *Lactobacillus* (Metchnikoff, 1907). En la última década ha habido un incremento de estudios relacionados con los probióticos, desarrollándose desde

el establecimiento de la definición de probióticos por la FAO/WHO (2002) más de 23.000 publicaciones según una búsqueda efectuada en enero de 2016 a través de Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)). En estos estudios existe un alto grado de evidencia sobre el poder de algunos de estos microorganismos en el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda, prevención de la diarrea asociada a antibióticos, mejora de los trastornos intestinales funcionales e infecciones vaginales, entre otros. (Lionetti y col., 2010; Fernández y col., 2014; Díaz y González, 2015). Por tanto, los microorganismos probióticos pueden ejercer numerosos efectos beneficiosos sobre el hospedador, muchos de los cuales pueden estar relacionados (Fig. 6). No obstante, es complicado generalizar cuando se habla de microorganismos probióticos, puesto que cada cepa tiene un efecto concreto sobre una o varias patologías determinadas, además es crucial hablar de la cantidad de bacteria ingerida, puesto que si no es la suficiente, no se obtendrán los efectos deseados (Hill y col., 2014; Kemgang y col., 2014).

**Figura 6.** Representación de algunos de los posibles efectos que los probióticos pueden ejercer en el hospedador (Rodríguez, 2015)



Actualmente existen varios organismos de referencia para abordar y difundir las investigaciones realizadas sobre los probióticos, como son la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) y la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP). La ISAPP reunió en 2013 a un panel de expertos para revisar los múltiples trabajos que se han realizado los últimos años, manteniendo la definición establecida en 2002 como óptima, destacando la necesidad de establecer un acuerdo para la regulación de los probióticos, facilitando así el desarrollo de nuevos probióticos (Hill y col., 2014). En este momento uno de los principales cometidos en la investigación de los probióticos es poder descifrar las interacciones existentes entre las bacterias comensales, y entre éstas y el hospedador (ILSI EUROPE, 2013; Hill y col., 2014). Cada vez se publican más estudios basados en el concepto de que nuestra salud se puede ver mejorada con el consumo de bacterias probióticas, siendo los productos lácteos fermentados enriquecidos en estos microorganismos los de mayor difusión. Aunque son numerosos los géneros y especies que podrían considerarse potenciales probióticos, la mayoría de las cepas comercialmente disponibles en alimentos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (ILSI EUROPE, 2013). La razón de esto es que probablemente sean los únicos, dentro de los que colonizan nuestras mucosas que son inocuos bajo (casi) cualquier circunstancia y por ello, han sido reconocidos como GRAS y QPS, por la FDA y la EFSA, respetivamente (Suárez, 2015).

### 1.2.2.1. Evaluación de microorganismos probióticos

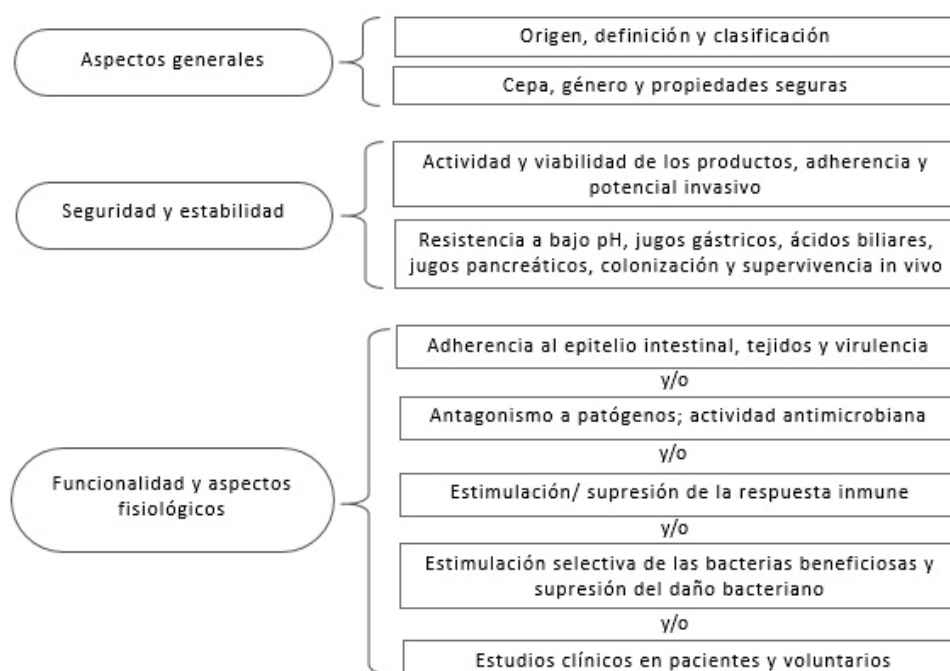
Para demostrar en un nuevo aislado posibles efectos probióticos son necesarios numerosos ensayos, desde la clasificación de la cepa a los ensayos *in vitro* e *in vivo*, hasta finalmente estudios clínicos. Además deben tenerse en cuenta aspectos como la seguridad de la cepa, la funcionalidad, los aspectos tecnológicos así como los aspectos comerciales. De los miles de cepas aisladas cada año por su presunto potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y muchas menos aún son las que se comercializan (Rodríguez, 2015).

La identificación a nivel de especie y cepa es fundamental, la evaluación del riesgo será más sencilla para cepas calificadas como QPS. *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son utilizados preferentemente como probióticos por su estatus GRAS y QPS. Según Rodríguez (2015), los probióticos podrían producir distintos tipos de efectos adversos, como infectividad o patogenicidad, producción de metabolitos no deseables, transmisión de genes de resistencia a antibióticos o excesiva inmunoestimulación o inmunodepresión en individuos sensibilizados. La evaluación de la seguridad se aborda a través de estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

También existen numerosos ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la funcionalidad, aunque la mayor parte de ensayos *in vitro* y *ex vivo* no permiten garantizar la funcionalidad del probiótico en un hospedador, por lo que son necesarios ensayos clínicos. Las cepas en estudio deben cumplir unos prerequisites, como ser componente de la microbiota normal del hospedador diana, resistir al tránsito gastrointestinal, capacidad de adherirse a células epiteliales, y disponer de propiedades como producción de sustancias antimicrobianas, de ácidos grasos de cadena corta, de compuestos bioactivos determinados, inmunomodulación, etc., que apunten a su efecto beneficioso.

El estudio de estas características se resume en el siguiente esquema:

Figura 7. Selección de criterios para probióticos (Gasser, 1994; Donohue y Salminen, 1996).





En cuanto a los aspectos tecnológicos a considerar en la evaluación de un probiótico, es fundamental la necesidad de obtener biomasa bacteriana de forma económicamente rentable, y que la concentración de bacterias viables se mantenga durante toda la vida útil del producto probiótico. Cada cepa presenta un comportamiento diferencial que obliga a definir parámetros de crecimiento y conservación para cada nuevo probiótico. Así, es necesario evaluar la capacidad fermentativa a pequeña escala para su posterior escalado. Esta fase debe ir ligada a la conservación posterior, siendo la liofilización el método más empleado. El objetivo de estos estudios es obtener un cultivo con  $>5 \times 10^{10}$  ufc/g, con una vida útil prolongada a temperatura ambiente o en refrigeración (Rodríguez, 2015). Finalmente, dependiendo de la matriz alimentaria a la que se pretende añadir el probiótico, será necesario conocer la viabilidad y la influencia organoléptica del probiótico en el producto final.

### 1.2.3. *Lactobacillus reuteri*

Es una BAL heterofermentativa, habitante autóctona del tracto gastrointestinal de humanos y animales (Valeur y col., 2004). *Lb. reuteri* fue aislada originalmente de heces humanas e identificada como *Lb. fermentum* Biotipo II (Lerche y Reuter, 1962), reclasificándose como *Lb. reuteri* años más tarde por Gerhard Reuter después de diversos estudios a nivel molecular (Kandler y col., 1980). En los años 80, justo después de haber sido reconocida como especie, *Lb. reuteri* fue aislada de multitud de nichos ecológicos como masa fermentada, carne, productos lácteos, y diversas partes del cuerpo humano como tracto gastrointestinal (TGI), tracto urogenital, leche materna y boca, así como en distintos animales vertebrados (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Vogel y col., 1994; Naito y col., 1995; Casas y Dobrogosz, 2000; Rodríguez y col., 2003; Jin y col., 2007). *Lb. reuteri* crece en anaerobiosis y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35-38 °C, siendo capaz de desarrollarse a valores de pH entre 5-7,5. Es capaz de fermentar carbohidratos como glucosa, fructosa, arabinosa, ribosa, sucralosa, lactosa, maltosa, melbiosa, rafinosa y gluconato (Gerez y col., 2008). Utiliza la ruta de la fosfocetolasa o de Warburg-Dickens para la fermentación de los carbohidratos (principalmente glucosa) a lactato, ácido acético, etanol o dióxido de

carbono (Sinkiewicz, 2010). Esta ruta tiene un bajo rendimiento energético que puede ser compensado por un aceptor externo de electrones como el glicerol, que permite a *Lb. reuteri* como bacteria heterofermentativa conseguir ATP del acetil fosfato (acetil fosfato + ADP → acetato + ATP), antes de la reducción del acetil fosfato a etanol y la consecuente pérdida de energía de transformación, obteniendo así un mayor rendimiento en presencia de glicerol (Talarico y col., 1990).

Se han comprobado diversas propiedades probióticas de *Lb. reuteri* (Casas y Dobrogosz, 1997, 2000; Morita y col., 2008), su disposición en la colonización del intestino, el poder inhibitorio frente a microorganismos patógenos gracias a su capacidad de producción de sustancias antimicrobianas, el uso de *Lb. reuteri* como agente terapéutico contra la diarrea o la modulación inmunomoduladora en la mucosa gastrointestinal (Shornikova y col., 1997a; Valeur y col., 2004; Niv y col., 2005; Weizman y col., 2005). Su capacidad probiótica ha sido relacionada con la producción de reuterina (Morita y col., 2008). *Lb. reuteri* se encuentra comercializada en diversos productos en el mercado (Vollenweider y col., 2003; Morita y col., 2008, WGO, 2011).

#### 1.2.3.1. Producción de sustancias antimicrobianas

Además de la reuterina, *Lb. reuteri* puede producir **reutericina 6** o **gassericina A**, una bacteriocina hidrófoba de pequeño tamaño y forma circular, cuya estructura le confiere gran estabilidad (Toba y col., 1991; Kabuki y col., 1997; Kawai y col., 2001). Presenta un amplio espectro de acción frente a patógenos alimentarios como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* (Kawai y col., 2001). Otro compuesto antimicrobiano producido por ciertos aislados de *Lb. reuteri* procedentes de masa panaria es la denominada **reuteriicina** (Höltzel y col., 2000), un ácido tetrámico con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas relacionadas con los alimentos como son *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* o *L. ivanovii* (Tieking y col., 2003; Lin y col., 2015).



### 1.2.3.2. Efectos beneficiosos atribuidos a *Lb. reuteri*

Se ha demostrado que determinadas cepas de *Lb. reuteri* intervienen en la prevención y/o tratamiento de distintas patologías, como son los trastornos funcionales digestivos, distintos tipos de diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal, infección por *Helicobacter pylori* o frente al cólico del lactante (Savino y Cordisco, 2010; Floch y col., 2011; WGO, 2011; Ciorba, 2012).

Se ha descrito que la ingesta diaria de *Lb. reuteri* ATCC 55730 disminuía el riesgo de contraer enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal en un 60% de individuos sanos (Tubelius y col., 2005) y en un 70% en niños tras su adición en fórmulas infantiles comparándolo con un placebo, reduciéndose los episodios y duración de la diarrea (Weizman y col., 2005). Este efecto podría deberse a la inhibición competitiva por la adherencia de las bacterias, síntesis de compuestos antimicrobianos, competición por el consumo de nutrientes, estimulación de la respuesta inmune frente a patógenos o reducción del pH.

El tratamiento con *Lb. reuteri* ATCC55730 disminuye la duración de diarrea debida a la presencia de rotavirus en niños (Shornikova y col., 1997b). En este trabajo se confirmó que dosis altas de  $10^{11}$  ufc/día fueron toleradas por individuos sanos durante siete días de tratamiento sin presentar ningún síntoma clínico, por lo que *Lb. reuteri* ATCC55730 se considera seguro e inocuo y no presenta problemas de intolerancia. Según un estudio realizado por Wolf y col. (1995), *Lb. reuteri* ATCC SD2112 fue capaz de colonizar el tubo digestivo en humanos a partir de los siete días de consumo. Según MacKenzie y col. (2010) las proteínas implicadas en la adherencia al intestino de *Lb. reuteri* son dependientes de cepa.

También se ha investigado el efecto protector de *Lb. reuteri* ATCC 55730 frente a *H. pylori* en estudios clínicos. *H. pylori* es un patógeno que afecta al 50% de la población y a largo plazo puede ser causante de úlcera péptica o cáncer de estómago. Tras la ingestión del probiótico durante cuatro semanas disminuyó la carga de *H. pylori*, así como los posibles síntomas gastrointestinales derivados (Francavilla y col., 2008). Este hecho se atribuyó a la especificidad en la unión glicolipídica de ambos microorganismos, facilitando la eliminación

del patógeno. El tratamiento durante 10 días con *Lb. reuteri* ATCC 55730 como alternativa a la terapia de antibióticos habitual mostró un efecto marcado en la disminución de la distensión abdominal, el dolor estomacal y la alteración en las evacuaciones (Lionetti y col., 2010).

Una de las características más importantes de la microbiota comensal es su incapacidad para atravesar la barrera epitelial. Sin embargo, si alguna de estas bacterias la atraviesa, es fagocitada rápidamente por los macrófagos de la mucosa del individuo sano, evitándose una activación de la respuesta inmunitaria intestinal (tolerancia), en contraposición con lo que ocurriría si fuese un microorganismo patógeno (Macpherson y col., 2000).

Ante la presencia en el intestino de un microorganismo patógeno, receptores como los TLR (del inglés toll-like-receptor) reconocen los PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), como es el caso de los LPS (lipopolisacáridos que son sintetizados por bacterias patógenas), y activan la transducción de la señal que induce la expresión de una gran variedad de genes implicados en el sistema inmunitario, como es el caso de las citoquinas. Cuando un PAMP es detectado por un TLR, se une al mismo y estimula la respuesta inflamatoria, los macrófagos se activan y se producen las citoquinas (Singer y Sansonetti, 2004).

La producción de factores antiinflamatorios por parte de *Lb. reuteri* es dependiente de cepa, presentando algunas cepas actividad antiinflamatoria y otras inmunoestimulante (Valeur y col., 2004; Niv y col., 2005). La formación de biofilms y la producción de reuterina, se han relacionado con el carácter inmunomodulador y con la inhibición de patógenos (Jones y Versalovic, 2009). Un estudio con dos cepas distintas de *Lb. reuteri* administradas en ratones confirmó un efecto inmunorregulador en el huésped así como la ausencia de efectos en la microbiota presente en el huésped (Livingstone y col., 2010). El efecto antiinflamatorio por parte de *Lb. reuteri* se ha comprobado en varios modelos colíticos de rata (Mao y col., 1996; Madsen y col., 1999; Peran y col., 2007). Así mismo, *Lb. reuteri* fue capaz de reducir la infiltración de los neutrófilos en el colon inflamado y de reducir la formación de TNF- $\alpha$  en un modelo TNBS de colitis (Peran y col., 2007).

### 1.3. OBJETIVOS

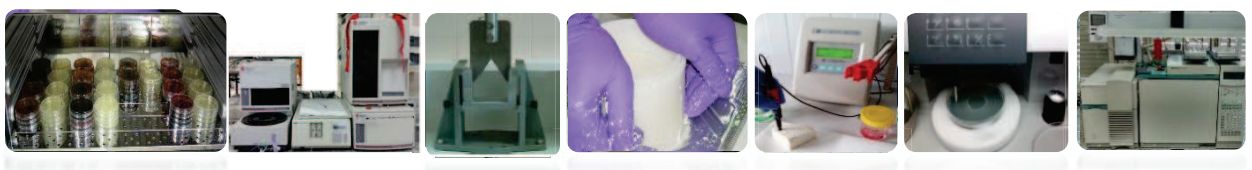
El objetivo general de esta tesis es el estudio de las propiedades antimicrobianas y probióticas de *Lb. reuteri* y de la reuterina como bioconservante alimentario. Para ello se abordaron los siguientes objetivos parciales:

- Producción de reuterina en medio de cultivo, leche y productos lácteos.
- Aplicación de reuterina purificada en combinación con altas presiones hidrostáticas en salmón ahumado y jamón cocido frente a *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* y estudio de las características de los productos.
- Empleo de *Lb. reuteri* como cultivo bioprotector en la fabricación de quesos. Efecto frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 y estudio de las características del queso.
- Capacidad probiótica de *Lb. reuteri*. Efecto protector *in vitro* e *in vivo*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---





## 2.1. MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1.1. Bacterias lácticas

En el presente trabajo se han empleado las siguientes bacterias lácticas:

- *Lactobacillus reuteri* INIA P569, INIA P570, INIA P571, INIA P572, INIA P572 pNZ:TuR-aFP marcado con evoglow, INIA P573, INIA P577 e INIA P579 de la colección del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA.
- *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103.

En las fabricaciones de queso y yogur se han utilizado los siguientes cultivos lácticos comerciales (CLC):

- MA 016: compuesto por cepas mesófilas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Texel, Groupe Rhône-Poulenc, Dangé Saint-Romain, Francia).
- YC- X16: compuesto por cepas termófilas de *Streptococcus thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

### 2.1.2. Bacterias patógenas

- *Listeria monocytogenes* INIA 2530 e INIA H66a de la colección del INIA, procedentes del ambiente de la industria alimentaria.
- *L. monocytogenes* OHIO serotipo 4b (FDA, Cincinnati, OH, EEUU).
- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CECT 4155, CECT 4300, CECT 4396.
- *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4972.

### 2.1.3. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se conservaron a -80 °C en caldo de cultivo adecuado para cada microorganismo suplementado con un 15% de glicerol. Todas las cepas se resembraron dos veces en caldo de cultivo antes de su empleo en los experimentos, excepto en los ensayos de leche y queso, en que se añadieron en leche desnatada reconstituida al 10% con extracto de levadura (0,3%).

Se utilizaron los siguientes medios y condiciones de cultivo:

Caldo MRS (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido) para el cultivo de las bacterias lácticas a 37 °C durante 18 h en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen™, Oxoid).

Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife, Milán, Italia) fue el medio de crecimiento de los CLC a 37 °C durante 24 h.

Tryptic Soy Yeast Extract Broth (TSYEB, Biolife) a 37 °C durante 18 h para el cultivo de microorganismos patógenos.

Brain Heart Infusion (BHI, Scharlab, Barcelona) para el cultivo de microorganismos patógenos a 37 °C durante 24 h.

TSYEA (Biolife) a 30 °C durante 72 h (TVC), PCA (Biolife) a 30 °C durante 48-72 h, GM17 (Biolife) a 30 °C durante 24 h y TSA (Biolife) a 30 °C durante 48-72 h para el recuento de los microorganismos totales (TVC, del inglés total viable counts).

Rogosa agar (Difco, Le Pont de Claix, Francia) y MRS agar (Oxoid) para el recuento de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus*, incubando a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis, excepto en el caso de la cepa pNZ:TuR-aFP en que se añadieron 10 µg/ml de cloranfenicol.

M17 agar suplementado con un 0,5% de glucosa (medio GM17) (Biolife) para el recuento del CLC MA 016 y para el recuento de YC-X16, MRS agar para *Lb. delbrueckii* y M17 agar para *S. thermophilus*.

Violet red bile agar (VRBA) (Oxoid) que se incubó a 37 °C durante 24 h para la determinación de coliformes.

PALCAM Listeria Selective Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para el recuento de *L. monocytogenes*, tras su incubación a 37 °C durante 48 h. Los enriquecimientos de *L. monocytogenes* se realizaron homogeneizando 25 g de muestra en 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* bajo en acriflavina (Biolife). Los caldos se incubaron a 37 °C durante 24-48 h y se sembraron sobre placas de agar PALCAM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h.

*Salmonella* Shigella Agar (SSA) (Scharlab) para el recuento de *Salmonella* a 37 °C durante 24 h.



Mc Conkey Sorbitol Agar (Scharlab) y suplemento selectivo Cefixime-Telurito (Oxoid) para los recuentos de *E. coli* O157:H7 con incubación a 37 °C durante 24 h. Enriquecimientos de 25 g de muestra y 225 ml de TSB con 1,5 % de sales biliares, 8 mg/l de vancomicina (Sigma) y suplemento selectivo cefixime-telurito (un vial/500 ml-0,05 mg cefixime/l).

La determinación de los grupos microbianos en fermentados de materia fecal utilizados en el modelo de simulación de colon se realizó en los siguientes medios y condiciones:

- Aerobios totales en Agar Wilkins-Chalgren (Oxoid) a 37 °C durante 48-72 h en anaerobiosis.
- *Lactobacillaceae* y *Lb. reuteri* en Agar Rogosa (Oxoid), añadiéndose 10 µg/ml de cloranfenicol en el caso de la cepa marcada con evoglow, y con una incubación a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis.
- Anaerobios totales en Agar Nutrient (Oxoid) a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis.
- *Clostridiaceae* en Agar Wilkins-Chalgren (Oxoid) suplementado con 8 mg/l de novobiocina (Sigma) y 8 mg/l de colistina (Sigma), e incubación durante 48-72 h a 37 °C en anaerobiosis.
- *Bacteroidaceae* en Agar Brucella blood-base (Oxoid) suplementado con 75 mg/l de kanamicina (Sigma), 5 mg/l hemina (Sigma), 75 mg/l vancomicina (Sigma), 50 mg/l de sangre de caballo (Sigma), incubando durante 24-72 h a 37 °C en anaerobiosis.
- *Enterobacteriaceae* en Agar MacConkey No 3 (Oxoid) e incubación durante 24-72 h a 37 °C en anaerobiosis.
- *Bifidobacteriaceae* en Agar Columbia (Oxoid) suplementado con 5 g/l de glucosa (Sigma), 0,5g/l cisteína (Sigma) y 0,5 g/l de ácido propiónico (Sigma) con incubación durante 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

Las diluciones decimales de los cultivos y las muestras se realizaron en agua peptonada estéril al 0,1% (Biolife) (Nuñez y col., 1985).

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *LB. REUTERI* PRODUCTORAS DE REUTERINA

### 2.2.1. Caracterización genotípica

Los aislados de *Lb. reuteri* fueron caracterizados genotípicamente por electroforesis en campos pulsados (PFGE). Para ello, se extrajo el ADN cromosómico en bloques de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Se llevó a cabo una macro-restricción del ADN genómico a 25 °C con endonucleasas *ApaI* (50 U/μl) y *SmaI* (20 U/μl) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) y los bloques se sometieron a electroforesis a 15 °C en un aparato CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, S.A., Alcobendas) de campos pulsados a 6 V/cm y una rampa lineal de 1-10 s por pulso durante 20 h. Se emplearon los marcadores PFGE de bajo rango (New England Biolabs) como estándares de tamaño molecular. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 μg/ml), se fotografiaron bajo luz UV, y se analizaron utilizando el programa Diversity Database (Bio-Rad).

### 2.2.2. Producción de reuterina en leche

Para investigar la producción de reuterina en leche se inocularon los distintos genotipos de *Lb. reuteri* en leche desnatada reconstituida y suplementada con 0, 25, 50, 100 ó 250 mM de glicerol (Panreac Química, Barcelona) junto con un 1% de CLC (MA 016), y se incubaron 24 h a 37 °C en anaerobiosis. Se centrifugó 1 ml del cultivo a 12000 g/ 5 min y se determinó la presencia de reuterina en el sobrenadante de acuerdo al método de Smiley y Sobolov (1962) mediante la deshidratación a acroleína. La acroleína resultante de la transformación del 3-HPA se determinó según el método colorimétrico de Circle y col. (1945), realizando diluciones seriadas en agua destilada estéril. La reacción se llevó a cabo añadiendo una solución de triptófano 0,01 M (Sigma) y ácido clorhídrico 0,01 N (Merck) junto con HCl 10 N. Las muestras se incubaron a 60 °C/ 5 min en un Thermomixer compacto (Eppendorf) y se determinó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, EEUU). Se preparó una curva estándar con

concentraciones de acroleína (Fluka; Sigma Aldrich Quimica SA, Madrid, España) de 0 a 6 mM para calcular la concentración de la reuterina en las muestras.

### 2.2.3. Producción de reuterina en productos lácteos modelo

#### 2.2.3.1. Queso

Se prepararon seis frascos con 200 ml de leche UHT semidesnatada Pascual (Aranda de Duero, Burgos) a 33 °C, a la que se le añadió 0,02% de CaCl<sub>2</sub>, un 1% de MA 016 (CLC) y 50 mM de glicerol. Cinco frascos se inocularon individualmente al 1% (aproximadamente 10<sup>6</sup> log ufc/ml) con cada uno de los cultivos de las distintas cepas de *Lb. reuteri*, actuando el sexto sin *Lb. reuteri* como control. Tras la adición de cuajo (Maxiren 150, Gist-Brocades, Delft, Holanda) a una concentración 0,015 g/l, la leche de cada frasco se distribuyó en seis recipientes estériles y se mantuvo a 37 °C durante 2 h. Las cuajadas obtenidas se mantuvieron a 25 °C durante 24 h y después se almacenaron a 12 °C durante 30 d bajo condiciones de anaerobiosis. El experimento se realizó por duplicado.

#### 2.2.3.2. Yogur

En cada ensayo se prepararon seis frascos con 200 ml de leche a 40 °C a los que se añadió un 5% de leche en polvo desnatada, YC-X16 (CLC) al 0,4% y 50 mM de glicerol. Cinco frascos se inocularon individualmente con un 1% (aproximadamente 10<sup>6</sup> log ufc/ml) de las distintas cepas de *Lb. reuteri*, actuando el sexto sin *Lb. reuteri* como control. La leche de cada frasco se distribuyó en recipientes de 25 ml y se incubó a 40-43 °C hasta alcanzar un pH de 4,55-4,60 (5 h aproximadamente). Los modelos de yogur se almacenaron a 6 °C durante 28 días en condiciones anaeróbicas. El ensayo se realizó por duplicado.

#### 2.2.3.3. Análisis microbiológico

Los quesos modelo se analizaron los días 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30, mientras que en los yogures se tomaron muestra los días 1, 3, 6, 9, 14, 21 y 28. En ambos productos se determinó el contenido de *Lb. reuteri* y del CLC según lo indicado en el apartado 2.1.3.

#### 2.2.3.4. pH

Las medidas de pH se realizaron por duplicado con un pH-metro GLP22 Crison y un electrodo de penetración (modelo 52-3,2; Crison Instruments S.A., Barcelona).

#### 2.2.3.5. Determinación de reuterina

Las muestras de quesos modelo y yogur se homogeneizaron y se centrifugaron (12000 g/ 20 min / 4 °C). Los sobrenadantes se filtraron (0,22 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU) y se emplearon para cuantificar la presencia de reuterina por triplicado según lo descrito en 2.2.2.

### 2.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA

#### 2.3.1. Producción de reuterina

Para la producción de reuterina se inoculó *Lb. reuteri* INIA P579 en recipientes de 2 l de caldo MRS que se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 18 h. Las células se recuperaron tras su centrifugación a 4500-5000 g/ 5 min y se lavaron con una solución 100 mM de glicerol. El pellet se resuspendió en un volumen total de 500 ml de agua-glicerol 100 mM y se incubó durante 3 h a 37 °C bajo condiciones de anaerobiosis. Las células se eliminaron tras centrifugar a 6000 g/ 5 min y el sobrenadante se transfirió a recipientes que fueron congelados a -20 °C hasta su posterior utilización.

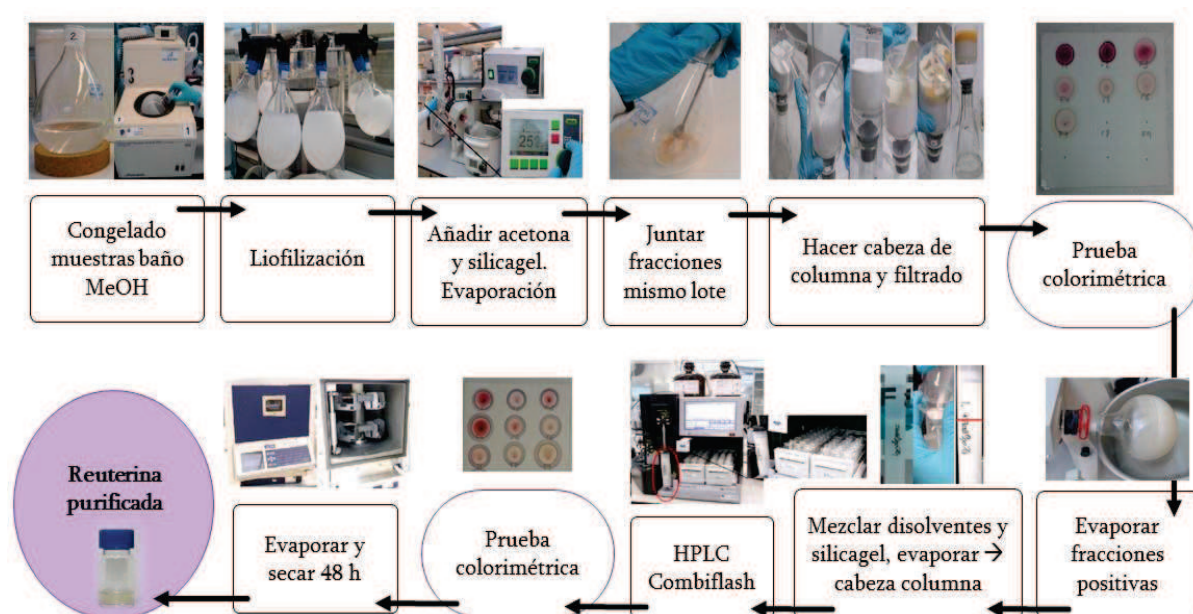
#### 2.3.2. Purificación de reuterina

La purificación de reuterina se realizó en la Fundación MEDINA, de acuerdo con la metodología de Vollenweider y col. (2003) con modificaciones.

Para ello, un volumen de 250 ml de la solución con reuterina se congeló mediante rotación en un baño de MeOH (-30 °C) para su liofilización en 20-24 h. Con el fin de eliminar las impurezas, el líquido viscoso resultante de la liofilización se resuspendió en 40

ml de acetona (Merck), se mezcló con 10 g de silica gel 60 (Merck), se evaporó en un rotavapor de vidrio Buchner y se filtró a través de unas placas que contienen 5 g de silica gel 60. La reuterina se eluyó con acetona: etil acetato (2:1) en un recipiente de vidrio de 100 ml y se detectó mediante el método colorimétrico descrito por Rahn y Schlenk (1973) para la detección de aldehídos.

Figura 8. Esquema de la purificación de la reuterina



Las fracciones con reuterina se concentraron bajo presión reducida, se cargaron en una columna de silica gel 60 y se eluyeron con acetona: etil acetato (2:1) usando un sistema de cromatografía CombiFlash RF4x (Teledyne Isco, Inc., Massachusetts, EEUU) y un flujo con una velocidad de 5 ml/min. Las fracciones con aldehído determinadas por el método colorimétrico indicado se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se secaron en un sistema de vacío para eliminar las últimas trazas de solventes. La pureza de la reuterina en las muestras se comprobó mediante espectrometría de masas por ionización con electrospray (HRESIMS) con un espectrómetro Bruker maXis QTOF y resonancia magnética nuclear (RMN) con un Bruker AVANCE III 500-MHz RMN equipado con un cryoprobe de 1,7 mm TCI. El espectrómetro de masas operaba en positivo, modo ESI y los parámetros

instrumentales fueron voltaje de capilaridad 4 kV, flujo del gas 1 l/min a 200 °C, y presión de nebulización de 2,8 bares. Los iones TFA-Na se emplearon como calibraciones de la masa en el instrumento antes de inyectar las muestras. El espectro del RMN (500 y 125 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, respectivamente) se registró en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , usando la señal del solvente residual como referencia interna (dH 3,31 y dC 49,0 ppm). La reuterina purificada y sin contaminantes se diluyó en agua destilada estéril hasta llegar una solución de 100 mg/ml y se almacenó a -40 °C hasta su uso.

### 2.3.3. Cuantificación de reuterina

La reuterina purificada se cuantificó de acuerdo con lo indicado en 2.2.2. La determinación se llevó a cabo por triplicado.

### 2.3.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de Chung y col. (1989) con modificaciones, utilizando *E. coli* K12 como microorganismo indicador. Se prepararon diluciones seriadas del stock de reuterina en agua estéril y se añadieron 150  $\mu\text{l}$  a una placa de 96 pocillos. A continuación se añadió el cultivo de *E. coli* K12 a  $10^4$  log ufc/ml en TSB doble fuerza. Como control negativo se utilizó agua destilada. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, determinando la absorbancia a 600 nm en un lector de placas Multiskan (Thermo Labsystem). Se calcularon los parámetros de la cinética, tasa de crecimiento ( $\mu$ ; expresado en  $\text{h}^{-1}$ ) y fase de latencia ( $\lambda$ , expresada en h) utilizando el software DMFit. Una unidad arbitraria de reuterina (UA) se define como el recíproco de la dilución más alta con la que no hay crecimiento del microorganismo indicador. Se realizaron tres ensayos independientes con tres réplicas por ensayo.

## 2.4. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA REUTERINA

La citotoxicidad de la reuterina purificada según el apartado anterior se estudió comparativamente con la de otros dos compuestos presentes en alimentos: acroleína y diacetilo.

### 2.4.1. Cultivos celulares y reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados fueron los siguientes: Ultraglutamina 1 (200 mM) (L-Gln), suero fetal bovino (FBS), penicilina y estreptomicina (P/S) (10000 U/ml / 10 mg/ml), aminoácidos no esenciales (NEAA) 100x, tripsina ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (200 mg/l EDTA, 17000 U tripsina/L) y medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) obtenido de Lonza (Barcelona). Se emplearon soluciones de reuterina purificada 78,12 – 10000  $\mu$ M, acroleína (Fluka) 9,8 – 1250  $\mu$ M, y diacetilo (Sigma-Aldrich) 78,12- 10000  $\mu$ M. El medio esencial mínimo sin rojo fenol (MEM) se obtuvo de PAN-Biotech (Aidenbach, Dinamarca).

Se empleó además Azul Alamar (Alamar Blue - AB) y 5- carboxifluoresceína diacetato, acetoxi metil ester (CFDA-AM) de Life Technologies (Madrid). La solución rojo de neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenanzina hidrocloreto) (0,33%), 6-carboxy-2'7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), 5-carboxifluoresceína (5-CF), resorufina, fluorescamina, cloramina-T trihidrato, dodecil sulfato de sodio (SDS) y albúmina de suero bovina (BSA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Se utilizó un cultivo de carcinoma hepático Hep G2, procedente de la ATCC (Manassas, VA, EEUU). Las células Hep G2 se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> de cultivos celulares Cell Star (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dinamarca) en EMEM suplementado con 1% NEAA, 1% P/S, 1% ultraglutamina y 10% FBS. Los frascos se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y subcultivado dos veces a la semana con tampón fosfato salino (PBS)/EDTA y tripsina.



## 2.4.2. Ensayos de citotoxicidad

En primer lugar se estudió la estabilidad de la reuterina en las condiciones de los ensayos de citotoxicidad: 1,3 mM de reuterina en medio MEM sin rojo fenol suplementado con 1% L-Gln, 1% P/S y 10% FBS (MEM+) durante 24 h de incubación a 37 °C. La concentración de reuterina se analizó mediante HPLC según el método descrito por Talarico y col. (1988) a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Se inyectaron 100 µL eluidos con una mezcla 65:35 de agua MilliQ y acetonitrilo para HPLC (LabScan, Polonia) que contenía 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El flujo era de 0,4 ml/min en una columna de intercambio iónico 300 x 7,8 mm HPX-87H Aminex (300 x 7,8 mm) protegida con cartucho Microguard (Bio-Rad) a temperatura ambiente en un sistema Beckman de cromatografía líquida Gold™ (Beckman Instruments S.A.), equipado con un módulo de solvente programable 126, un muestreador automático 508 y un detector de índice de refracción (Knauer, Berlin, Alemania). La concentración de reuterina se calculó mediante la altura de pico empleando una curva patrón con concentraciones conocidas de reuterina de entre 0,325 y 2,60 mM.

La toxicidad de la reuterina frente a la línea celular Hep G2 se evaluó simultáneamente mediante tres ensayos relacionados con distintos mecanismos causantes de citotoxicidad: captación del rojo neutro (Neutral Red Uptake - NRU), basado en la capacidad de las células viables para captar y mantener en los lisosomas funcionales el rojo neutro; ensayo AB, relacionado con la actividad metabólica de la célula; y el ensayo CFDA-AM, que proporciona información sobre posibles alteraciones en la integridad de la membrana celular. El protocolo de siembra y exposición fue similar para todos los ensayos.

Las células Hep G2 se sembraron en placas de 96 pocillos, transparentes de fondo plano (área de crecimiento: 0,34 cm<sup>2</sup>) (Greiner Bio-One GmbH). Se añadieron 100 µl de suspensión celular ( $7,5 \times 10^5$  células/ml) a cada pocillo. A continuación, se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Reuterina, acroleína y diacetilo se diluyeron 1:10 en medio MEM+ y se añadieron a los pocillos con cultivo celular, dónde se llevaron a cabo diluciones seriadas (dilución de factor 2). Como control positivo, un subconjunto de pocillos se trató con concentraciones crecientes de SDS (0,02 mM – 0,5 mM y factor de dilución 1,5). Las células tratadas con MEM+ sirvieron como control



negativo y las células tratadas con un 10% (v/v) agua Milli-Q/MEM+ sirvieron como medio control. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> durante 24 h para su posterior análisis.

Los ensayos NRU, AB y CFDA-AM se realizaron según una versión modificada (Lammel y col., 2013) del protocolo descrito por Dayeh y col. (2005). Antes de añadir las muestras, se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con 200 µl de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de suero y MEM sin rojo fenol con un 1,25% (v/v) de AB y 4 µM de CFDA-AM. Las placas se incubaron durante 30 min en oscuridad a 37 °C y una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente la intensidad de la fluorescencia se midió en excitación y emisión a las longitudes de onda 532 nm y 590 nm (resorufina) ó 485 y 535 nm (5-CF), respectivamente, usando un lector de microplacas (Tecan Genios, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Se eliminó el medio y las células se lavaron una vez con PBS. Se añadieron 100 µl de la solución de rojo neutro (NR) (0,03 mg/ml en MEM+) por pocillo y se dejaron incubar las placas 1 h en oscuridad a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras el periodo de incubación, la solución NR se desechó, las células se lavaron dos veces con 200 µl de PBS y el NR retenido en las células se extrajo con una solución acidificada 1% ácido acético glacial /50% etanol /49% agua Milli-Q (150 µl/pocillo). La fluorescencia del NR se midió a 532 nm / 680 nm (excitación/emisión) empleando el lector de microplacas. Los valores de fluorescencia se corrigieron con el control sin células y se normalizó frente al medio de control.

## 2.5. APLICACIÓN DE REUTERINA COMO BIOCONSERVANTE

### 2.5.1. Efecto combinado de reuterina y diacetilo sobre microorganismos patógenos

Se investigó el efecto antimicrobiano de la reuterina producida en placas de medio de cultivo con glicerol por *Lb. reuteri* INIA P569, INIA P570, INIA P572, INIA P577 e INIA P579 utilizando como controles negativos cepas no productoras (*Lb. reuteri* INIA P581, INIA P582 e INIA P583) en combinación con diacetilo y a distintos valores de pH. Como microorganismo indicador de la actividad antimicrobiana se empleó *E. coli* K12, así como los microorganismos patógenos *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*.

También se evaluó el efecto combinado de la reuterina purificada obtenida según lo descrito en el apartado 2.3.

#### 2.5.1.1. Actividad antimicrobiana de reuterina producida *in situ* en combinación con diacetilo

La actividad antimicrobiana de la reuterina *in situ* se investigó según una modificación del método de la doble capa de agar descrito por Spinler y col. (2008). Para ello, se inoculó la primera capa de agar BHI con una gota de 2  $\mu$ L de los cultivos de *Lb. reuteri* que se incubó durante 18 h a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. A continuación se cubrió con otra capa de BHI con 0,7% de agar suplementado con glucosa 20 mM y glicerol 50 mM inoculado con 6 log ufc/ml del cultivo del patógeno en estudio (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis o *L. monocytogenes*). Se aplicaron distintas concentraciones de diacetilo (0–100 mg/kg) (Sigma-Aldrich), un pH de 5,0 con ácido láctico (Panreac, Barcelona) y se ensayaron las cepas *Lb. reuteri* INIA P572 e INIA P579. Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 h en condiciones anaeróbicas y a continuación en aerobiosis hasta 24 h. Como controles negativos se utilizaron las placas sin glicerol y con *Lb. reuteri* no productores de reuterina. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

#### 2.5.1.2. Determinación de la cinética de inactivación de reuterina purificada en combinación con diacetilo

Se analizó la cinética de inactivación de los microorganismos patógenos en placas multipocillo con 200  $\mu$ l de TSB que contenían 10<sup>6</sup> log ufc/ml de cada cepa patógena y diferentes combinaciones de reuterina purificada (0, 1, y 2 UA/ml) y diacetilo (0–100 mg/kg) según lo indicado en 2.3.4. Los patógenos se estudiaron de manera independiente por triplicado.

### 2.5.1.3. Actividad antimicrobiana de reuterina purificada en leche en combinación con diacetilo

Las cepas patógenas se inocularon individualmente a  $10^3$  ufc/ml aproximadamente en leche desnatada reconstituida suplementada con distintas concentraciones de reuterina purificada (0, 1, ó 2 UA/ml), diacetilo (0–250 mg/kg) y al pH normal (aproximadamente 6,6) y acidificado a 5,0 con ácido láctico al 10%. La leche se incubó a 37 °C y los recuentos de *E. coli*, *S. Enteritidis*, y *L. monocytogenes* se determinaron por duplicado según lo descrito en 2.1.3. El experimento se realizó por duplicado.

### 2.5.2. Inactivación de microorganismos patógenos en salmón ahumado mediante bioconservantes y altas presiones

Se investigó el efecto de la reuterina así como de los bioconservantes sistema lactoperoxidasa (SLP) y lactoferrina (LF) aplicados individualmente o en combinación con tratamientos de altas presiones hidrostáticas (APH) en la inactivación de *L. monocytogenes*, *S. Enterica* y *E. coli* en salmón ahumado. Para ello, se prepararon muestras de 20 g para los estudios de inactivación de patógenos y 80 g para investigar la influencia de los tratamientos sobre las características del producto, microorganismos totales, el pH y la  $a_w$ , la textura, el color y el contenido en aminos biógenas.

Figura 9. Muestra de salmón con reuterina



Las muestras se contaminaron con 100  $\mu$ L del cultivo de los microorganismos patógenos en la superficie con el fin de alcanzar un nivel de población de  $10^6$  ufc/ g aproximadamente y se mantuvieron a 4 °C durante 20 h antes de la aplicación de los

tratamientos. Los patógenos investigados fueron *L. monocytogenes* INIA 2530, un cóctel de tres cepas de *S. Enteritidis* CECT 4155, 4300 y 4392 y *E. coli* O157:H7 CECT 4972. Las muestras se dividieron en ocho grupos: Control (muestras no presurizadas y sin antimicrobianos), REU (con reuterina), SLP (con el sistema lactoperoxidasa), LF (con lactoferrina), APH (presurizadas), REU + APH (presurizadas con reuterina), SLP + APH (presurizadas con el sistema lactoperoxidasa) y LF + APH (presurizadas con lactoferrina). Los antimicrobianos se añadieron justo antes de la presurización.

La reuterina se suspendió en agua destilada estéril y se añadió a la superficie del salmón a una actividad final estimada de 8 UA/g.

El SLP se activó mediante la adición de 2,8 U/g de LP bovina (DMV International, Veghel, Holanda), 40 µl/g de KSCN y 10 µl/g de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los reactivos se añadieron siempre siguiendo este orden. Se preparó una solución de LP de 15 mg/ml en agua desionizada estéril. El KSCN se añadió a partir de una solución 1 M esterilizada a 121 °C durante 15 min y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se preparó a una concentración 4 M. Las soluciones de LP y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon diariamente y se mantuvieron protegidas de la luz hasta su uso.

La actividad LP se determinó por triplicado según el método de Marshall y col. (1986), siguiendo la oxidación del ácido 2, 2'-azinodi-3-etilbenztiazolina-6-sulfónico (ABTS) (Sigma-Aldrich) a 412 nm. Para ello, se preparó el blanco de la reacción añadiendo a una cubeta de 3 ml de capacidad 2,95 ml de la solución ABTS 1 mM en tampón acetato 0,1 M y 30 µl de una solución LP 150 µg/ml. A continuación se añadieron 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM. La oxidación del ABTS se siguió mediante la determinación de los valores de absorbancia durante 5 min, a 10 lecturas por minuto, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de un micromol de sustrato (ABTS) por minuto, a 20 °C en tampón acetato 0,1 M a una concentración de ABTS 1 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM, y es equivalente a un cambio en la absorbancia a 412 nm de 32,4 por minuto. La pendiente de la recta de regresión obtenida proporciona la absorbancia por minuto a partir de la cual se calcula la actividad LP en U/ml, siendo el coeficiente de extinción molar del producto de oxidación del ABTS de 32400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Shindler y col., 1976).

La LF bovina (DMV International) se preparó en agua destilada estéril (50 mg/ml) y se utilizó esa solución stock para los ensayos. Esta solución se esterilizó filtrándose con 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La LF se añadió al 0,1%.

Las APH se aplicaron en un equipo discontinuo modelo ACIP 6000 (ACB, Nantes, Francia) con un cilindro de 3,5 l de capacidad, en la Planta de Tecnología de Alimentos del INIA, con un cilindro de 3,5 l de capacidad. La presión máxima alcanzada por el equipo es de 600 MPa.

Figura 10. Equipo de altas presiones



Tras añadir los antimicrobianos, las muestras se envasaron al vacío en bolsas BB325 (Cryovac Sealed Air Corporation, Milan, Italia) con una permeabilidad al  $\text{O}_2$  de  $25\text{ cm}^3/\text{m}^2$  al día a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 0 % humedad relativa (HR)) y se sellaron utilizando una envasadora a vacío Tecnotrip EVT-7-TD (Terrasa, Barcelona). A continuación fueron presurizadas a 450 MPa/5 min. El agua fue el fluido transmisor de la presurización, con una temperatura inicial de  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  que se incrementó debido al calentamiento adiabático entre 4 y  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la presurización. Tras los tratamientos, las muestras se mantuvieron a 4 y  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 35 d de almacenamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 2.5.2.1. Análisis microbiológicos

Se tomaron muestras a los 0, 1, 7, 21 y 35 d de almacenamiento y se analizaron los TVC, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7, según lo indicado en el apartado 2.1.3.

#### 2.5.2.2. Análisis físico-químicos

Las medidas de pH se realizaron por duplicado con un pH-metro GLP22 Crison (Crison Instruments S.A., Barcelona, España) en muestras de 10 g homogeneizadas con 90 ml de agua destilada estéril en un stomacher durante 90 s. Los análisis se efectuaron los días 1, 21 y 35.

La  $a_w$  se determinó por duplicado en muestras de 10 g utilizando un Aqua Lab Water Activity Meter Serie 3 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EEUU) con un sensor de punto de rocío. Estas determinaciones se realizaron los días 1, 21 y 35.

#### 2.5.2.3. Análisis de textura

La textura del salmón se midió con una prensa Instron Universal Testing Machine 4301 (Instron Ltd., Barcelona) con algunas modificaciones del protocolo de Veland y Torrissen (1999) y el software Blue Hill V2.0. Se utilizó una célula de corte, Warner-Bratzler, con 1 KN de fuerza máxima y una velocidad de 100 mm/min. Se prepararon probetas con forma de paralelepípedos (5 x 3 x 1 cm) y se determinó la fuerza al corte, parámetro indicativo del endurecimiento del músculo. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente (21-23 °C) con al menos tres medidas por muestra. Los análisis de textura se realizaron los días 0 y 35.

#### 2.5.2.4. Análisis de color

Los cambios de color se evaluaron utilizando un colorímetro CM-700d y el software Spectramagic NX (Konica Minolta Ltd., Osaka, Japón), con el observador y el iluminante configurados a 10 y D65, respectivamente. Se siguió la escala de color CIELAB (Schanda,

2007) donde el parámetro  $L^*$  es la luminosidad de las muestras de 0 (negro) a 100 (blanco),  $a^*$  es el eje de color desde rojo (+) a verde (-) y  $b^*$  es el eje de color desde amarillo (+) hasta azul (-). Las medidas de cada parámetro se determinaron en diferentes lugares de las muestras del salmón y el valor final se obtuvo con la media de ocho mediciones por filete. Para asegurar una medición precisa del color se realizó una calibración del cero y una calibración del blanco antes de la medida de las muestras.

#### 2.5.2.5. Determinación de la formación de aminas biógenas

La extracción de aminas biógenas en el salmón ahumado se realizó por duplicado siguiendo el método de Eerola y col. (1993). Se pesaron 5 g de muestra en tubos Falcon estériles y se mezclaron con 10 ml de una solución de HCl 0,1 M que contenía un 0,2% de ácido 3,3-tiodipropiónico (TDPA) (Sigma-Aldrich). Las muestras se homogeneizaron en una Ultra-Turrax T10 durante 2 min a 2000 rpm. Los tubos se taparon con Parafilm y se introdujeron 15 min en un baño de ultrasonidos. Los homogeneizados se centrifugaron a 5000 g/ 20 min y 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de membranas con poros de 0,45  $\mu$ m y 0,5 ml del filtrado se desproteinizó mediante ultrafiltración en eppendorf UF 3000 (Millipore) (pre-lavados con HCl 0,1 M y centrifugados a 5000 g/ 30 min) y centrifugación a 4.500 g durante 1 h. Se descartaron los insertos y se congelaron los extractos a -20 °C hasta su uso.

El análisis cuantitativo, tras la derivatización con cloruro dabsyl se llevó a cabo con HPLC de fase reversa usando el Sistema Gold (Beckman Instruments S. A.) de cromatografía líquida, de acuerdo con Romero y col. (2000). Todas las separaciones se hicieron por duplicado en la columna Waters Nova-Pak C18 (39×150 mm) (Waters Mildford, MA, EEUU). El estándar de la mezcla de aminas biógenas (triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina y espermina) (Sigma-Aldrich) se analizó para la posterior identificación y cuantificación de las aminas biógenas. El límite de detección fue aproximadamente de 0,2 mg/kg, excepto para la triptamina cuyo estándar fue de 0,5 mg/kg. Las aminas biógenas se analizaron los días 0 y 35 del experimento.

### 2.5.3. Inactivación de microorganismos patógenos en jamón cocido mediante bioconservantes y altas presiones

Se investigó el efecto de la reuterina así como de los bioconservantes SLP y LF aplicados individualmente o en combinación con tratamientos de APH en la inactivación de *L. monocytogenes*, *S. Enterica* y *E. coli* O157:H7 en jamón cocido. Para ello, se prepararon muestras de 20 g de jamón cocido fileteado que se inocularon en superficie con 100 µL del cultivo de los patógenos estudiados en salmón ahumado en la superficie con el fin de alcanzar un nivel de población aproximadamente de  $10^6$  ufc/g. Las muestras inoculadas se mantuvieron a 4 °C durante 20 h antes de la aplicación de los tratamientos de inactivación. Se aplicaron los tratamientos indicados en 2.5.2. Igualmente, se prepararon muestras de 80 g sin inocular para el resto de las determinaciones.

#### 2.5.3.1. Análisis microbiológicos

Se tomaron muestras a los 0, 1, 7, 21 y 35 d y se analizaron los TVC, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7, según lo indicado en 2.1.3.

#### 2.5.3.2. Análisis físico-químicos

La determinación de pH y  $a_w$  se evaluó según lo indicado en 2.5.2.2.

#### 2.5.3.3. Análisis de textura

El estudio de la textura en el jamón cocido según lo indicado en 2.5.2.3.

#### 2.5.3.4. Análisis de color

La determinación de color se realizó según lo indicado en 2.5.2.4.



Figura 11. Colorímetro CM-700d (Konica Minolta)

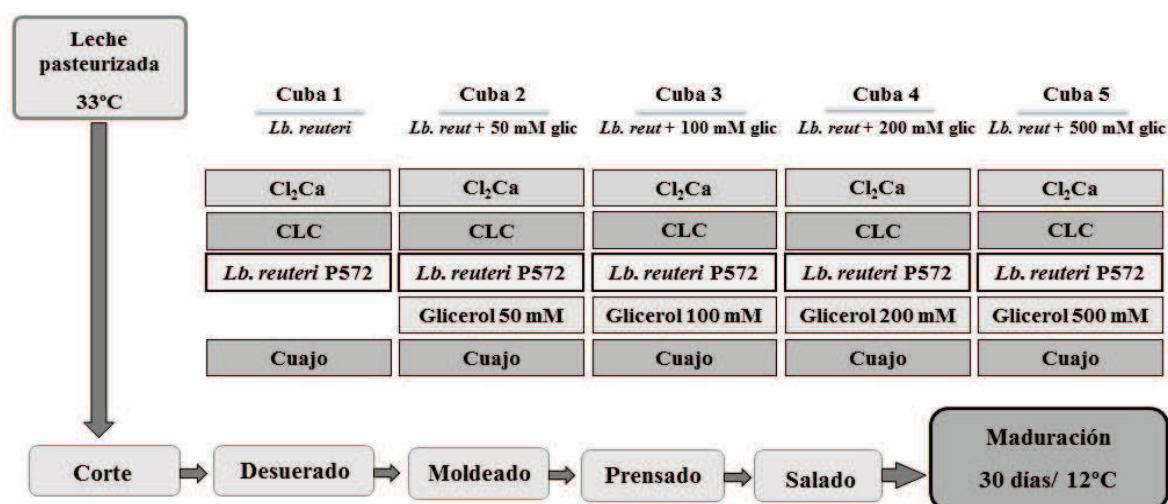


## 2.6. DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR DE *LB. REUTERI*/INIA P572 PARA SU APLICACIÓN EN QUESOS

### 2.6.1. Optimización de la producción de reuterina en queso con distintas concentraciones de glicerol

Se realizaron dos fabricaciones de queso con leche entera pasteurizada (Priégola, Villanueva del Pardillo, Madrid). En cada ensayo la leche a 33 °C con 0,02% de CaCl<sub>2</sub> se repartió en cinco cubas de 2 l. El CLC (MA 016) se añadió al 1% y *Lb. reuteri* INIA P572 a una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> log ufc/ml en cada una de las cubas. Se adicionó cuajo (Maxiren 150) a la leche 20 min después de inocular los cultivos junto con glicerol. La cuba 1 sirvió como control sin glicerol y a las cubas 2, 3, 4 y 5 se añadieron concentraciones de glicerol de 50, 100, 200 y 500 mM, respectivamente. A los 45 min de la adición del cuajo se calentó la cuajada hasta 37 °C durante 20 min y se realizó el corte en cubos de 2 mm. La cuajada se desueró durante 30 min y se distribuyó en moldes cilíndricos. Los quesos fueron prensados aproximadamente a 1,5 kg/cm<sup>2</sup> durante 18 h a temperatura ambiente. Se salaron en salmuera al 15% durante 20 min a 12 °C, se envasaron a vacío en bolsas de plástico de Cryovac y se maduraron a 12 °C durante 30 d.

Figura 12. Esquema de fabricación de quesos



### 2.6.1.1. Análisis microbiológicos

Los quesos se analizaron los días 1, 5, 10, 15, 20 y 30. Se homogeneizaron muestras de 5 g con 45 ml de solución estéril de citrato de sodio y se prepararon diluciones decimales en agua de peptona al 0,1%. Los recuentos de *Lb. reuteri* y CLC se determinaron según lo indicado en el apartado 2.1.3.

### 2.6.1.2. Análisis físico-químicos

El pH se determinó los días 1, 5, 10, 15, 20 y 30 utilizando un electrodo de penetración según lo descrito en el apartado 2.2.4.4. Los análisis se realizaron por duplicado.

### 2.6.1.3. Determinación de reuterina

La producción de reuterina por *Lb. reuteri* INIA P572 en los quesos se evaluó mediante el método colorimétrico descrito en el apartado 2.2.3. y se confirmó por HPLC según lo descrito en el apartado 2.4.2. Para ello se pesaron 2 g de queso sin corteza y se añadieron 4 ml de agua estéril. La mezcla se homogeneizó, se centrifugó (12000 g/ 20 min/ 4°C) y los sobrenadantes filtrados (0,22 µm) se analizaron por HPLC. Para la cuantificación mediante ambas técnicas se realizaron curvas estándar adicionando reuterina purificada (0-30 µmol/g) a los quesos fabricados sin *Lb. reuteri* ni glicerol.

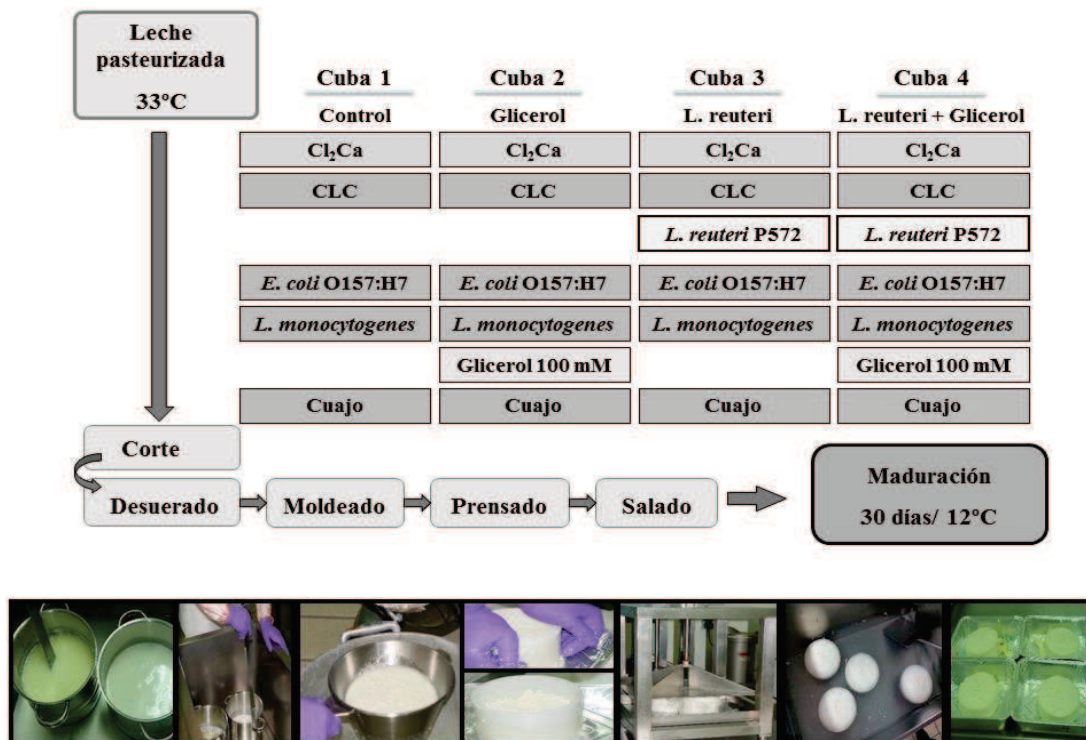
#### 2.6.1.4. Análisis de color

La determinación de color del queso los días 7, 14, 21 y 28 se realizó según lo indicado en el apartado 2.5.2.4. Además se evaluó el efecto de la adición de distintas concentraciones de reuterina purificada (0-20  $\mu\text{mol/g}$ ) en el color de los quesos control elaborados sin *Lb. reuteri* ni glicerol.

#### 2.6.2. Inactivación de patógenos en queso mediante la adición del cultivo bioprotector *Lb. reuteri* INIAP572

Se elaboraron quesos según lo indicado en el apartado 2.6.1. a partir de la leche inoculada con *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, a una concentración aproximada de  $10^4$  ufc/ml después de añadir el  $\text{CaCl}_2$ . Se partió de cubas con 3 l de leche con glicerol 100 mM. Se fabricaron cuatro cubas, la primera sin *Lb. reuteri* ni glicerol, la segunda con glicerol, la tercera con *Lb. reuteri* y la cuarta con *Lb. reuteri* y glicerol. La fabricación se realizó por duplicado.

Figura 13. Esquema de fabricación de quesos con patógenos



#### 2.6.2.1. Análisis microbiológicos

Se determinaron los niveles de TVC, *Lb. reuteri*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 los días 1, 7, 15 y 30. Los análisis se realizaron por duplicado según lo indicado en 2.1.3.

#### 2.6.2.2. Análisis físico-químicos

El pH se determinó los días 1, 7, 15 y 30 de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2.4.4. Los análisis se realizaron por duplicado.

#### 2.6.3. Efecto de la adición del cultivo bioprotector de *Lb. reuteri* INIA P572 en las características del queso

Se realizaron dos fabricaciones de queso según lo indicado en el apartado 2.6.2. sin añadir microorganismos patógenos.

##### 2.6.3.1. Análisis microbiológicos

Se determinaron los niveles de TVC y *Lb. reuteri* INIA P572 los días 1, 7, 14 y 30, según lo indicado en el apartado 2.1.3.

##### 2.6.3.2. Análisis físico-químicos

El pH se determinó los días 1, 7, 15 y 30 de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2.4.4. Los análisis se realizaron por duplicado.

##### 2.6.3.3. Determinación de la proteólisis

Se analizaron las distintas fracciones proteicas en queso mediante electroforesis capilar de gel de acuerdo con el método descrito por Calzada y col. (2013a) en un equipo de P/ACE™ MDQ controlado por un software 32 Karat (Beckman Instruments). Se utilizaron los estándares comerciales (Sigma-Aldrich)  $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG bovinas, la albúmina sérica y la lactoferrina. Para calcular el peso molecular de los picos se monitorizó a 214 nm, el coeficiente relativo de tiempo de movilidad del patrón interno (PI) de 10 kDa

(Beckmann Instruments) y se comparó con la mezcla de proteínas estándar de 10, 20, 35, 50, 100, 150 y 225 kDa (estándar de tamaño y peso molecular SDS, Beckman Instruments). Los picos de las proteínas fueron cuantificados con respecto al área del PI y expresados como mg proteína/mg muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La proteólisis total del queso se determinó por duplicado mediante el ensayo con o-ftalaldehído (OPA), basado en la reacción de los grupos  $\alpha$ -amino con la solución de OPA en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol para formar un aducto que absorbe a 340 nm, de acuerdo a lo descrito por Church y col. (1983). Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 2.6.3.4. Determinación de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles del queso se extrajeron utilizando microextracción en fase sólida (SPME) (Calzada y col., 2013b). Se homogeneizaron 10 g de muestra en una picadora mecánica (IKA, Labortechnik, Staufen, Alemania) con 20 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 50  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de ciclohexanona como patrón interno (PI) a una concentración de 1,058 mg/l. A continuación se pesaron 5 g de esa mezcla que se pusieron en un vial de vidrio de 15 ml de volumen sellado con un tapón de politetrafluoretileno y un septum de silicona (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). Los viales se sumergieron en un baño termostático a 37 °C (D3 model, Haake, Berlin, Alemania) para las fases de equilibrio (20 min) y extracción (30 min). Las fases de inyección y desorción (260 °C/ 10 min en modo splitless) se llevaron a cabo usando un auto-muestreador CTC Combi PAL (Agilent Technologies, Inc., Loveland, Colorado, EEUU). Antes de usarse, la fibra Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco) se acondicionó en el lugar de inyección del CG (270 °C/ 1 h) como recomienda el fabricante. Después de cada análisis, la fibra se limpiaba para evitar posibles problemas con el remanente y periódicamente la sensibilidad de la fibra se testaba con una solución acuosa de patrón interno. Todos los análisis se realizaron con la misma fibra. El cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas utilizaba un aparato HP 6890-MSD HP 5973 (Agilent) con una columna capilar (60 m long; 0,25 mm i.d.; film de espesura 0,5  $\mu\text{m}$ ; Zebron-WAX plus, Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) y un flujo de helio de 1,4 ml/min. El programa de

temperatura fue el siguiente: 7 min a 40 °C la primera rampa, 2 °C/min hasta los 90 °C, 3 °C/min hasta 150 °C y rampa final 9 °C/min hasta llegar a 240 °C, y mantenimiento de 8 min a 240 °C. La detección de masa se llevó a cabo con una ionización por impacto de los electrones, con una energía de ionización de 70 eV operando en un modo de escáner completo a una velocidad de 1,74 escáner/s. Las temperaturas de la fuente y el cuadrupolo fueron 230 y 150 °C, respectivamente. Las abundancias relativas de los compuestos se expresaron como porcentajes de las áreas de sus picos respecto del área de la ciclohexanona. La identificación de compuestos se resolvió con la inyección de estándares comerciales (Sigma) y por comparación de espectros utilizando la biblioteca Wiley7Nist05 Library (Wiley and Sons Inc., Weinheim, Alemania). La suma de abundancias de los iones característicos se utilizó para la semicuantificación de los compuestos. La abundancia relativa de los compuestos volátiles se calculó multiplicando las áreas de los respectivos picos por  $10^3$  y dividiendo por el área de la ciclohexanona. Las áreas se refieren al PI que se calculó así; (área del pico compuesto/ área del pico del PI) x concentración del PI.

## 2.7. PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE *LACTOBACILLUS REUTERI* INIA P572

### 2.7.1. Supervivencia en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Se estudió la supervivencia a condiciones gastrointestinales de *Lb. reuteri* INIA P572 y la misma cepa marcada con evoglow (Landete y col., 2015) según lo descrito por Haller y col. (2001) con alguna modificación. Se crecieron las cepas en caldo MRS durante 18 h y se centrifugaron a 7000 g/ 5 min, se resuspendió el pellet en leche semidesnatada UHT y se hizo un recuento inicial. La solución de leche se diluyó 1:10 en PBS y se ajustó a pH 3 con HCl. Tras incubar una hora a 37 °C en anaerobiosis se realizó el recuento en agar Rogosa. A continuación se añadió oxgall (Oxoid) al 0,15% (pH 8,0) y se incubó una hora a 37 °C en anaerobiosis, tras la que se realizó el recuento correspondiente. Los ensayos se efectuaron por duplicado.

### 2.7.2. Producción de reuterina en un modelo de colon

Los experimentos se realizaron en el Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido), utilizando la cepa de *Lb. reuteri* marcada.

El medio de fermentación se preparó a partir de una muestra de heces de un voluntario sano que no hubiese tomado antibióticos en los últimos 6 meses. Las muestras se diluyeron 1:10 (peso/vol) con PBS 0,1 M (previamente mantenido 18 h en anaerobiosis), a pH 7 y homogeneizado en un Stomacher (Seward, Reino Unido) durante 2 min. Una dilución 1:10 del homogeneizado se inoculó al 2% con el cultivo de *Lb. reuteri* en los fermentadores (300 ml) junto con 135 ml de medio de cultivo con la siguiente composición: agua de peptona (2 g/l) (Oxoid), extracto de levadura (2 g/l) (Oxoid), NaCl (0,1 g/l) (Sigma), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,04 g/l) (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Reino Unido), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,04 g/l) (Fisher), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,01 g/l) (Riedel-de Haën), CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,01 g/l) (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania), NaHCO<sub>3</sub> (2 g/l) (Fisher), Tween™ 80 ACROS Organics™ (2 ml) (Fisher), hemina (0,05 g/l) (Sigma), vitamina K1 (10 µl) (Sigma), cisteína HCl (0,5 g/l) (Fisher), sales biliares (0,5 g/l) (Oxoid), d(+) glucosa (10 g/l) y agua destilada, pH 7,0.

Las condiciones de fermentación se mantuvieron con una inyección de N<sub>2</sub> constante y a 37 °C mediante un baño de agua circulante. El pH se mantuvo entre 6,6 y 7,0 con un controlador de pH (Electrolab, Reino Unido), y agitación constante. Antes de inocular el fermentador con las heces diluidas (vol/vol) se añadieron 3 ml (2%) del cultivo de *Lb. reuteri* INIA P572.

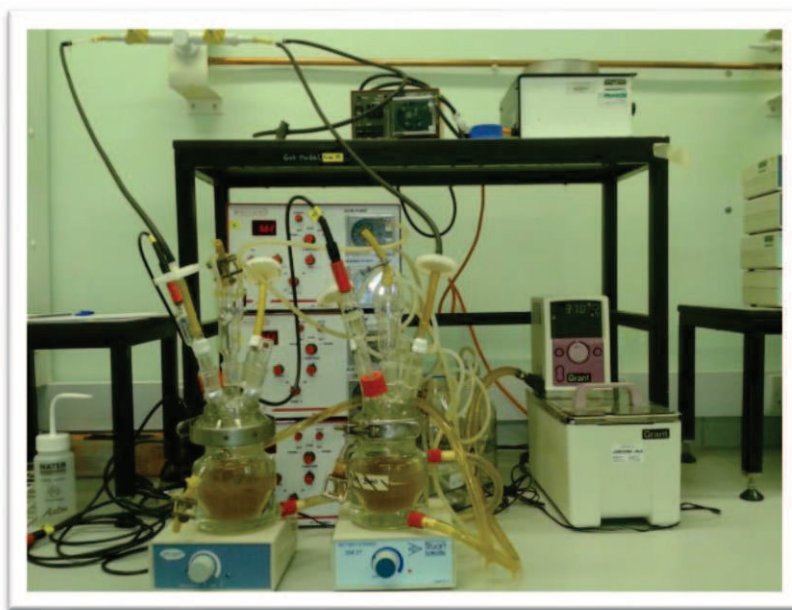
La producción de reuterina se evaluó en las siguientes condiciones:

- Control: Con *Lb. reuteri* INIA P572 (2%).
- Reuterina: Con *Lb. reuteri* (2%) y glicerol 100 mM.

Se tomaron muestras a las 0, 6 y 24 h para hacer recuentos de los principales grupos microbianos presentes en las heces: aerobios y anaerobios totales, *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* y *Lb. reuteri* INIA P572. Asimismo se determinó la producción de reuterina en las muestras mediante la reacción de Circle y col. (1945), según lo indicado en el apartado 2.2.3.



Figura 14. Simulador de colon del IFR



La presencia de reuterina se confirmó mediante  $^1\text{H}$  RMN. Para ello, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se filtró con  $0,22\ \mu\text{m}$  para eliminar las bacterias. El filtrado se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta la realización de los análisis. Se utilizó reuterina purificada como patrón. Todos los experimentos se realizaron por triplicado haciendo diluciones seriadas con PBS.

### 2.7.3. Estudio de la actividad inmunomoduladora de *Lb. reuteri* INIA P572 en cultivos celulares de macrófagos murinos RAW 264.7

Los experimentos se realizaron en el Centro para la Calidad de los Alimentos del INIA en Soria.

Se investigó la actividad inmunomoduladora de *Lb. reuteri* INIA P572 y de *Lb. rhamnosus* GG. Para ello se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana de  $10^7$  ufc/ml a 1800  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo con gentamicina (Lonza) (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

La línea celular de macrófagos RAW 264.7 obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), se cultivó en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina (Sigma). El cultivo celular se



mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador HF160W (Heal Force, Australia) mediante sucesivos subcultivos.

Para la activación del cultivo celular se despegaron las células del frasco y se centrifugaron a 1160 g/ 5 min, a continuación se resuspendió el pellet, se contaron en la cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de células a 10<sup>6</sup> cel/ml. Se sembraron 200 µl de la suspensión celular (2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) en placas de 96 pocillos y se incubaron 18 h en el incubador de CO<sub>2</sub>. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µl del medio con los cultivos microbianos (180 µl en los pocillos a los que se añadieron lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli*, serotype 0127:B8). En los ensayos de estimulación por LPS al cabo de 1 h de incubación se añadieron 20 µl de solución de LPS a una concentración de 1 µl/ml. Las placas se incubaron 24 h en el incubador de CO<sub>2</sub> y a continuación los sobrenadantes se congelaron hasta realizar los ensayos.

#### 2.7.3.1. Producción de óxido nítrico (NO)

Los nitritos acumulados en el medio de cultivo se midieron como un indicador de la producción de NO, basado en la reacción de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftiletildiamida-HCl, y 2% ácido fosfórico) (Sigma) (Green y col., 1982). Tras 24 h en presencia/ausencia de LPS, se centrifugó la placa a 1160 rpm y se recogieron los sobrenadantes. Se añadieron a una placa de lectura 50 µl de muestra (2 x 10<sup>5</sup> cel/pocillo) junto con 50 µl de los estándares de nitrito sódico con los que se realizó la curva patrón (2,5, 5, 10, 20 50 µM). Asimismo se añadieron a cada pocillo 50 µl del reactivo de Griess. Se incubó a temperatura ambiente, se dejó en oscuridad durante 10 min, y se leyó a 540 nm en el lector de placas FluoStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La cantidad de nitrito presente en las muestras se calculó con los valores de la curva estándar de NaNO<sub>2</sub> en medio fresco de cultivo.

#### 2.7.3.2. Viabilidad celular

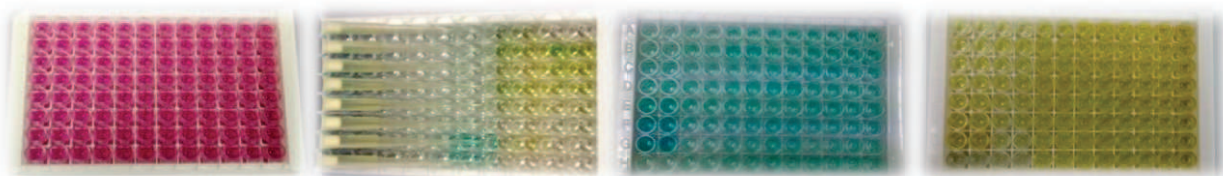
Se realizó un ensayo colorimétrico basado en la habilidad de las mitocondrias de las células viables para reducir el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-

difeniltetrazol) (Sigma) (Ferrari y col., 1990). Se sembraron  $5 \times 10^3$  células en cada pocillo. Tras 24 h de incubación con las bacterias se centrifugó la placa a 1160 rpm y se retiraron los sobrenadantes. Se lavó la placa 2 veces con PBS precalentado a 37 °C para eliminar las bacterias. Se añadió MTT en medio de cultivo DMEM incoloro con gentamicina para lograr una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó a 37 °C, con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% de HR durante 3 h a oscuras. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) y se agitó antes de leerse a 560 nm. A partir de los valores de absorbancia obtenidos se calcularon las medias de los triplicados para calcular el porcentaje de supervivencia tras 24 h de exposición.

### 2.7.3.3. Producción de citoquinas

Los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en el medio de cultivo se determinaron con kits de ELISA Duo Set de ratón de acuerdo con los protocolos R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU). Se estudiaron el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 producidos por los macrófagos de manera individual así como en presencia de *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG, tomándose el valor de las citoquinas producidas por los macrófagos sin los probióticos como el 100%. Se investigó también la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por los macrófagos en presencia de LPS (1 µg/ml) tomado como el 100%, frente a la producción en presencia de los dos probióticos previamente estimulados con LPS (1 µg/ml).

Figura 15. Distintas fases de estudio del kit ELISA



### 2.7.4. Actividad probiótica *in vivo*

Los estudios de experimentación animal se realizaron según las directrices descritas en la normativa vigente, el Real Decreto 1201/2005, la Directiva Europea 86/609/CEE y el Convenio Europeo del Consejo de Europa ETS 123. Los experimentos se realizaron en

colaboración con el CIBM (Centro de Investigación Biomédica) y la Universidad de Granada.

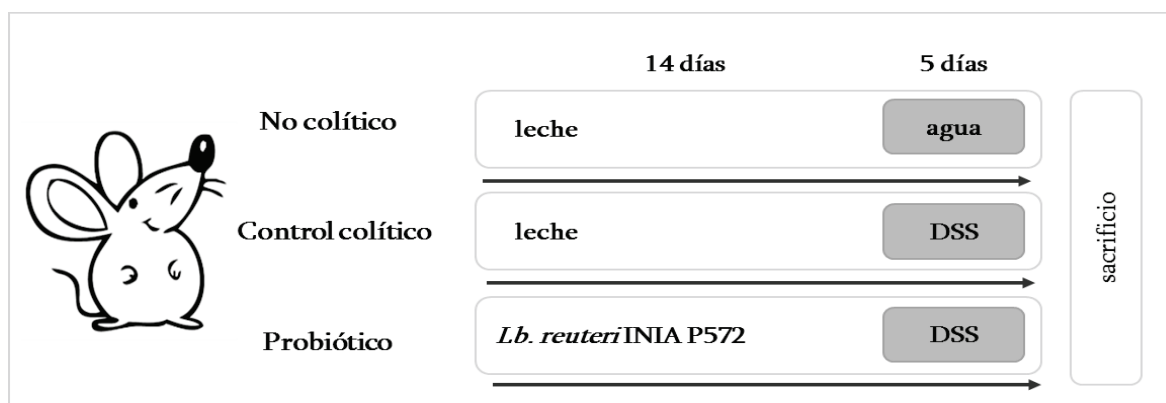
#### 2.7.4.1. Efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo *in vivo* de colitis experimental

Se utilizó un modelo de colitis experimental en ratones inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) según el método descrito por Garrido-Mesa y col. (2015). Los animales empleados para este estudio fueron ratones C57BL/ 6J (7-9 semanas; aproximadamente 20 g) obtenidos de Harlan (Barcelona). Los animales se mantuvieron en el animalario del laboratorio al menos 7 días antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de  $22\pm 2$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Los ratones fueron alojados en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestos en un estante de acero inoxidable, alimentados con la correspondiente dieta para roedores y agua corriente *ad libitum*. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en distintos grupos:

- Grupo **sano** (n=10): se les suministró diariamente (vía gastroesofágica) 200 µl de leche semidesnatada (Pascual) durante todo el experimento.
- Grupo **control colítico** (n=10): se les suministró diariamente (vía oral) 200 µl de leche semidesnatada (Pascual) durante todo el experimento, y a los 14 d se comenzó la inducción de colitis con DSS.
- Grupo **probiótico** (n=10): se les suministró diariamente 200 µl de leche con *Lb. reuteri* INIA P572 durante todo el experimento a una dosis de  $5 \times 10^8$  log ufc/ml, y a los 14 d se comenzó la inducción de colitis con DSS.

El DSS se suministró en el agua de beber a una concentración del 3% por un periodo de 5 d, después se retiró durante un día y a continuación los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical.

**Figura 16.** Diseño experimental del modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS



#### 2.7.4.2. Valoración del proceso inflamatorio intestinal

Se llevó un control diario durante todo el experimento del peso del animal, de la cantidad de alimento y agua ingerida así como de la consistencia de las heces. A estos parámetros se les asignó una puntuación de acuerdo con lo propuesto por Cooper y col. (1993) y se utilizó para calcular el DAI o índice de la enfermedad.

**Tabla 1.** Baremo del índice de enfermedad (DAI)

Baremo	Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	Ninguna	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Heces blandas	
3	10-20%		
4	>20%	Diarrrea	Sangrado total

El valor del DAI es la combinación de las puntuaciones obtenidas de la pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado rectal dividido para 3, adaptado de Cooper y col. (1993).

Una vez sacrificados los animales, se extrajo de modo aséptico el colon, se pesó y se midió siempre con una carga constante (2 g). Se tomaron muestras transversales de tejido colónico (0,5 cm de longitud) para la realización de los correspondientes estudios

histológicos. El tejido colónico restante se seccionó en fragmentos longitudinales para determinaciones bioquímicas y aislamiento de RNA.

#### 2.7.4.3. Estudio histológico

Las secciones fijadas en parafina se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina, evaluando el daño histológico de acuerdo con el criterio establecido por Arribas y col. (2010).

#### 2.7.4.4. Expresión génica de biomarcadores en tejido colónico mediante qRT-PCR

El RNA total de las muestras se aisló utilizando el RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Todas las muestras de RNA fueron cuantificadas con el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 y 2  $\mu\text{g}$  de RNA se retrotranscribieron usando primers oligo (dT) (Promega, Southampton, Reino Unido). La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo usando los cebadores específicos indicados en la Tabla 2 (Garrido-Mesa y col., 2015; Utrilla y col., 2015).

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR de los ensayos de tejido colónico

Gen	Secuencia (5'-3')	T <sup>a</sup> anillamiento
GAPDH	FW CCATCACCATCTTCCAGGAG RV CCTGCTTCACCACCTTCTTG	60
TNF- $\alpha$	FW AACTAGTGGTGCCAGCCGAT RV CTTACACAGAGCAATGACTCC	56
IL-1 $\beta$	FW TGATGAGAATGACCTCTTCT RV CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA	55
IL-6	FW TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC RV TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	60
MMP-9	FW TGGGGGGGCAACTCGGC RV GGAATGATCTAAGCCCAG	60
iNOS	FW GTTGAAGACTGAGACTCTGG RV GACTAGGCTACTCCGTGGA	56
ICAM-1	FW GAGGAGGTGAATGTATAAGTTATG RV GGATGTGGAGGAGCAGAG	60
MCP-1	FW CAGCTGGGGACAGAATGGGG RV GAGCTCTCTGGTACTCTTTTG	62
MUC-2	FW GATAGGTGGCAGACAGGAGA RV GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	60
ZO-1	FW GGGGCCTACACTGATCAAGA RV TGGAGATGAGGCTTCTGCTT	56
Occludin	FW ACGGACCCTGACCACTATGA RV TCAGCAGCAGCCATGTACTC	56

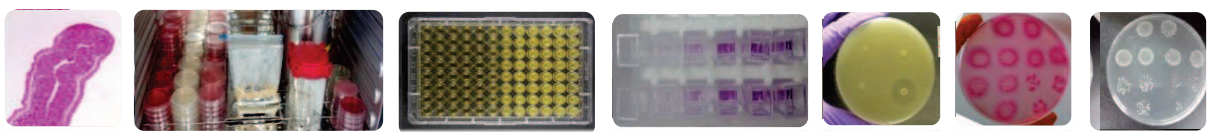
Los genes analizados fueron GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ), IL-6 (interleukin 6), MMP-9 (metalloproteinase), iNOS (inducible nitric oxide synthase), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), MCP-1 (monocyte chemotactic protein), MUC-2 (mucin), ZO-1 (zonulae occludens), occludin (Garrido-Mesa y col., 2015; Utrilla y col., 2015).

La reacción de qPCR se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en un sistema PCR 7500 real-time (PE Applied Biosystems, CA, EEUU) según lo descrito por Garrido-Mesa y col. (2015).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---







### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE REUTERINA

En el presente trabajo se utilizaron siete aislados de *Lb. reuteri* productores de reuterina y pertenecientes a la colección de cultivos del INIA.

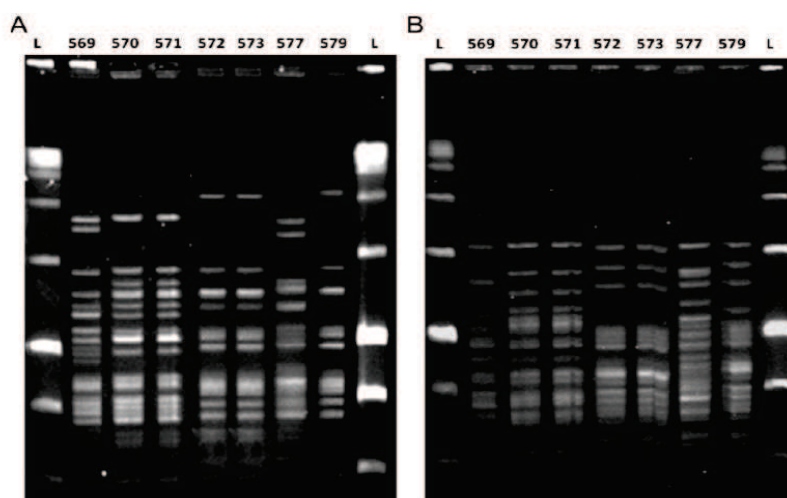
#### 3.1.1. Diferenciación de los aislados de *Lb. reuteri* mediante PFGE

Con el objetivo de caracterizar las cepas de *Lb. reuteri* productoras de reuterina se tipificaron siete aislados mediante PFGE, obteniéndose 5 perfiles o pulsotipos distintos correspondientes a los aislados *Lb. reuteri* INIA P569, INIA P570, INIA P572, INIA P577 e INIA P579.

Figura 17. Clasificación de los aislados de *Lb. reuteri* según los pulsotipos obtenidos

<u>Aislados</u>	<u>Pulsotipos</u>
<i>Lb. reuteri</i> INIA P569	<i>Lb. reuteri</i> INIA P569
<i>Lb. reuteri</i> INIA P570	<i>Lb. reuteri</i> INIA P570
<i>Lb. reuteri</i> INIA P571	<i>Lb. reuteri</i> INIA P572
<i>Lb. reuteri</i> INIA P572	<i>Lb. reuteri</i> INIA P572
<i>Lb. reuteri</i> INIA P573	<i>Lb. reuteri</i> INIA P577
<i>Lb. reuteri</i> INIA P577	<i>Lb. reuteri</i> INIA P577
<i>Lb. reuteri</i> INIA P579	<i>Lb. reuteri</i> INIA P579

Figura 18. Pulsotipos de *Lb. reuteri* caracterizados por PFGE con *Apa*I (A) y *Sma*I (B)



L: low-range PFG marker

La técnica PFGE de los patrones del ADN cromosómico de *Lactobacillus* se considera una de las más apropiadas para su genotipado (Jacobsen y col., 1999). Los análisis con PFGE utilizando los enzimas de restricción *ApaI* y *SmaI* nos han permitido distribuir los siete aislados en cinco pulsotipos, agrupando *Lb. reuteri* INIA P570 y P571, así como *Lb. reuteri* INIA P572 y P573.

### 3.1.2. Producción de reuterina en leche y productos lácteos modelo

#### 3.1.2.1. Leche

Se estudió la producción de reuterina en leche con los cinco pulsotipos de *Lb. reuteri* caracterizados por PFGE y el cultivo láctico comercial (CLC) MA 016. Se adicionaron distintas concentraciones de glicerol (0-250 mM) y las muestras se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 24 h (Tabla 3).

**Tabla 3.** Producción de reuterina (mmol/l) por *Lb. reuteri* en leche con el cultivo láctico comercial (CLC) MA 016 y distintas concentraciones de glicerol (0-250 mM) tras 24 h a 37 °C en anaerobiosis

Glicerol	<i>Lb. reuteri</i>				
	P569	P570	P572	P577	P579
0 mM	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
10 mM	1,94 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>	2,32 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>
25 mM	4,64 <sup>ab</sup>	6,21 <sup>b</sup>	11,21 <sup>b</sup>	9,61 <sup>b</sup>	12,01 <sup>b</sup>
50 mM	10,99 <sup>b</sup>	9,70 <sup>b</sup>	13,90 <sup>b</sup>	10,02 <sup>b</sup>	13,35 <sup>b</sup>
100 mM	11,22 <sup>b</sup>	9,39 <sup>b</sup>	12,82 <sup>b</sup>	9,84 <sup>b</sup>	13,22 <sup>b</sup>
250 mM	9,89 <sup>b</sup>	8,83 <sup>b</sup>	11,74 <sup>b</sup>	8,82 <sup>b</sup>	12,10 <sup>b</sup>

Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ )

Las cepas más productoras fueron *Lb. reuteri* INIA P572 e INIA P579, que alcanzaron las mayores concentraciones de reuterina, de 13,90 y 13,35 mmol/l, respectivamente, al añadir 50 mM de glicerol. Esta fue la concentración elegida para la elaboración de productos lácteos modelo, queso y yogur.

### 3.1.2.2. Queso

Se estudió la producción de reuterina en quesos modelo por los cinco pulsotipos de *Lb. reuteri* y 50 mM de glicerol. Los quesos maduraron durante 30 d a 12 °C. Los resultados se recogen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Producción de reuterina (mmol/l) en queso modelo con *Lb. reuteri* como adjunto al CLC

	1 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
CLC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CLC + P569	0,13	0,30	0,25	0,89 <sup>a</sup>	0,49	0,28	0,23
CLC + P570	1,44 <sup>a</sup>	2,46 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>	1,57 <sup>a</sup>	0,70	0,11	0,08
CLC + P572	0,68	1,83 <sup>a</sup>	5,71 <sup>a</sup>	5,16 <sup>a</sup>	4,65 <sup>a</sup>	2,78 <sup>a</sup>	2,59 <sup>a</sup>
CLC + P577	0,81	0,55	1,10	1,27	1,49	1,21	1,15
CLC + P579	1,59 <sup>a</sup>	2,29 <sup>a</sup>	5,52 <sup>a</sup>	4,18 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	2,85 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana detectada frente a *E. coli* K12

En los quesos modelo elaborados con las cepas *Lb. reuteri* INIA P572 y P579 se alcanzó un máximo de reuterina a los 10 d, de 5,71 y 5,52 mmol/l respectivamente. Las cepas de *Lb. reuteri* INIA P569, P570 y P577 produjeron una cantidad de reuterina inferior, con valores superiores a 2 mmol/l únicamente con *Lb. reuteri* INIA P570 a los 5 y 10 d de maduración. Asimismo, se investigó la actividad antimicrobiana en los quesos modelo frente a *E. coli* K12. *Lb. reuteri* INIA P570 consiguió inhibir esta bacteria hasta el día 15 de maduración, mientras que con la cepa P569 sólo se registró inhibición el día 15 y con la cepa P577 no se observó actividad antimicrobiana. Sin embargo en los quesos elaborados con *Lb. reuteri* INIA P572 o P579 se consiguió inactivar a *E. coli* K12 desde el día 5 al día 30 de maduración.

**Tabla 5.** Recuentos (log ufc/ml) de *L. lactis* y *Lb. reuteri* en quesos modelo con *Lb. reuteri* como adjunto al CLC

		1 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
<i>L. lactis</i>	CLC	9,17 <sup>a</sup>	9,33 <sup>a</sup>	9,22 <sup>a</sup>	8,75 <sup>a</sup>	7,52 <sup>a</sup>	6,81 <sup>a</sup>	6,55 <sup>a</sup>
	CLC + P569	9,15 <sup>a</sup>	9,44 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	7,07 <sup>ab</sup>	5,70 <sup>b</sup>	5,90 <sup>ab</sup>	5,77 <sup>a</sup>
	CLC + P570	9,03 <sup>a</sup>	9,19 <sup>a</sup>	8,56 <sup>a</sup>	5,85 <sup>abc</sup>	5,15 <sup>c</sup>	5,51 <sup>b</sup>	5,42 <sup>a</sup>
	CLC + P572	9,14 <sup>a</sup>	9,20 <sup>a</sup>	7,51 <sup>a</sup>	4,11 <sup>bc</sup>	3,33 <sup>e</sup>	1,17 <sup>d</sup>	1,71 <sup>b</sup>
	CLC + P577	9,15 <sup>a</sup>	9,30 <sup>a</sup>	9,17 <sup>a</sup>	5,33 <sup>abc</sup>	4,25 <sup>d</sup>	3,59 <sup>c</sup>	4,57 <sup>a</sup>
	CLC + P579	9,09 <sup>a</sup>	9,24 <sup>a</sup>	7,05 <sup>a</sup>	2,52 <sup>c</sup>	0,50 <sup>f</sup>	1,36 <sup>d</sup>	0,15 <sup>b</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	CLC	-	-	-	-	-	-	-
	CLC + P569	5,52 <sup>b</sup>	5,64 <sup>a</sup>	5,63 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	4,07 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup>	3,79 <sup>a</sup>
	CLC + P570	5,00 <sup>ab</sup>	5,17 <sup>a</sup>	5,26 <sup>a</sup>	4,95 <sup>a</sup>	2,39 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,49 <sup>a</sup>
	CLC + P572	5,06 <sup>ab</sup>	5,27 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>	2,99 <sup>a</sup>
	CLC + P577	4,82 <sup>ab</sup>	4,48 <sup>a</sup>	4,83 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup>	3,57 <sup>a</sup>	3,44 <sup>a</sup>
	CLC + P579	5,08	5,26 <sup>a</sup>	5,01 <sup>a</sup>	4,85 <sup>a</sup>	3,55 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	2,39 <sup>a</sup>

Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) para cada microorganismo y tiempo

Los niveles del cultivo iniciador fueron disminuyendo a lo largo de la maduración (Tabla 5), en queso control sin *Lb. reuteri*, con un descenso de 3 u. log a los 30 d. Este descenso fue superior en los quesos con las cepas que habían mostrado mayor capacidad de producción de reuterina, *Lb. reuteri* INIA P572 y P579, con valores de 1,71 y 0,15 log ufc/g, respectivamente, al final de la maduración. Sin embargo, en los quesos inoculados con *Lb. reuteri* INIA P569, P570 y P577, la reducción fue menor y no se detectaron diferencias significativas en la población de *L. lactis* comparado con los quesos sin cultivos productores de reuterina. La concentración de reuterina en quesos elaborados con esas cepas fue inferior a 2,5 mM durante los 30 d de almacenamiento. *Lb. reuteri* también experimentó una reducción en sus niveles durante el almacenamiento a 12 °C que fue mayor en el queso con la cepa de *Lb. reuteri* INIA P579.

### 3.1.2.3. Yogur

Se estudió la producción de reuterina en yogures modelo elaborados con el CLC YC-X16 y las distintas cepas de *Lb. reuteri* con 50 mM de glicerol. Los resultados se exponen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Producción de reuterina (mmol/l) en yogur modelo con *Lb. reuteri* como adjunto al CLC

	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	28 d
CLC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CLC + P569	0,21	0,08	0,06	0,18	0,13	0,07	0,03
CLC + P570	0,74	1,21 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>	0,77	0,52	0,41	0,34
CLC + P572	0,74	0,73	0,90	1,23 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,73 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>
CLC + P577	0,27	0,25	0,28	0,42	0,24	0,20	0,29
CLC + P579	0,55	0,84	0,94	1,16 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>	1,05

<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana detectada frente a *E. coli* K12

En los modelos de yogur se detectó una producción mayor de reuterina con las cepas de *Lb. reuteri* INIA P572 e INIA P579 confirmando los resultados obtenidos en los ensayos en leche y queso modelo. Las concentraciones máximas de 1,73 y 1,53 mmol/l se obtuvieron a los 21 y 14 d a 6°C con las cepas INIA P579 y P572, respectivamente. *Lb. reuteri* INIA P569 fue la cepa menos productora.

Los niveles de *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de CLC permanecieron constantes durante los 28 d de almacenamiento, sin diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre los recuentos obtenidos en los yogures inoculados con las distintas cepas de *Lb. reuteri* (Tabla 7). Al contrario de lo sucedido en los quesos modelo, los inóculos de *Lb. reuteri* no afectaron a los recuentos de *S. thermophilus* ni a *Lb. delbrueckii* en los yogures modelo.

**Tabla 7.** Recuentos (log ufc/ml) de *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. reuteri* en yogur modelo con *Lb. reuteri* como adjunto al CLC

	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d	21 d	28 d
<i>S. thermophilus</i>							
CLC	9,18 <sup>a</sup>	9,13 <sup>a</sup>	9,13 <sup>a</sup>	9,13 <sup>a</sup>	9,10 <sup>a</sup>	9,07 <sup>a</sup>	9,76 <sup>a</sup>
CLC + P569	9,20 <sup>a</sup>	9,13 <sup>a</sup>	9,16 <sup>a</sup>	9,06 <sup>a</sup>	9,03 <sup>a</sup>	9,06 <sup>a</sup>	9,40 <sup>a</sup>
CLC + P570	9,26 <sup>a</sup>	9,17 <sup>a</sup>	9,15 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	8,97 <sup>a</sup>	8,81 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>
CLC + P572	9,10 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	9,14 <sup>a</sup>	9,11 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	9,36 <sup>a</sup>
CLC + P577	9,18 <sup>a</sup>	9,14 <sup>a</sup>	9,07 <sup>a</sup>	9,14 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	9,36 <sup>a</sup>
CLC + P579	9,16 <sup>a</sup>	9,17 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	9,05 <sup>a</sup>	8,78 <sup>a</sup>	8,59 <sup>a</sup>	8,98 <sup>a</sup>
<i>Lb. delbrueckii</i>							
CLC	4,70 <sup>a</sup>	4,46 <sup>a</sup>	4,77 <sup>a</sup>	4,79 <sup>a</sup>	4,99 <sup>a</sup>	4,73 <sup>a</sup>	4,47 <sup>a</sup>
CLC + P569	4,80 <sup>a</sup>	4,82 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	4,82 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a</sup>	4,66 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>
CLC + P570	4,53 <sup>a</sup>	4,61 <sup>a</sup>	4,55 <sup>a</sup>	4,78 <sup>a</sup>	5,18 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,12 <sup>a</sup>
CLC + P572	4,49 <sup>a</sup>	4,58 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,56 <sup>a</sup>	4,47 <sup>a</sup>	4,76 <sup>a</sup>	4,38 <sup>a</sup>
CLC + P577	4,49 <sup>a</sup>	4,53 <sup>a</sup>	4,59 <sup>a</sup>	4,77 <sup>a</sup>	5,12 <sup>a</sup>	4,81 <sup>a</sup>	4,46 <sup>a</sup>
CLC + P579	4,83 <sup>a</sup>	4,85 <sup>a</sup>	4,73 <sup>a</sup>	4,55 <sup>a</sup>	3,72 <sup>a</sup>	4,89 <sup>a</sup>	4,45 <sup>a</sup>
<i>Lb. reuteri</i>							
CLC	-	-	-	-	-	-	-
CLC + P569	4,95 <sup>a</sup>	4,99 <sup>a</sup>	4,06 <sup>a</sup>	4,94 <sup>a</sup>	4,92 <sup>a</sup>	4,51 <sup>a</sup>	3,02 <sup>a</sup>
CLC + P570	5,88 <sup>ab</sup>	6,00 <sup>b</sup>	5,27 <sup>ab</sup>	5,67 <sup>a</sup>	5,84 <sup>a</sup>	5,61 <sup>ab</sup>	5,50 <sup>b</sup>
CLC + P572	6,06 <sup>b</sup>	6,30 <sup>b</sup>	5,35 <sup>ab</sup>	6,19 <sup>a</sup>	6,17 <sup>a</sup>	6,02 <sup>ab</sup>	5,78 <sup>b</sup>
CLC + P577	5,74 <sup>ab</sup>	5,64 <sup>ab</sup>	4,82 <sup>ab</sup>	5,27 <sup>a</sup>	5,24 <sup>a</sup>	5,24 <sup>ab</sup>	5,38 <sup>b</sup>
CLC + P579	6,25 <sup>b</sup>	6,48 <sup>ab</sup>	6,13 <sup>b</sup>	5,95 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	6,08 <sup>b</sup>	5,88 <sup>b</sup>

Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) para cada microorganismo y tiempo

Los recuentos de *Lb. reuteri* variaron en función de la cepa inoculada. Con *Lb. reuteri* INIA P569 se observó un descenso hasta un valor de 3,02 log ufc/ml al final del periodo de almacenamiento, significativamente menor que el registrado en el resto de yogures. Las cepas con recuentos finales más elevados fueron *Lb. reuteri* INIA P572 y P579. Esta observación parece estar más relacionada con la temperatura de almacenamiento que podría acelerar el proceso de muerte celular, que con los valores de pH o la concentración de reuterina en los productos lácteos. De acuerdo con nuestros resultados, no se detectó

crecimiento de *Lb. reuteri* en yogur durante el almacenamiento a 6 °C, ni una disminución significativa de los recuentos de CLC adjunto después de 28 d a 6 °C.

Cuando se inoculó la cepa de *Lb. reuteri* RC 14 en leche a temperaturas de refrigeración (Hekmat y col., 2007) se obtuvieron resultados similares a los registrados en el presente trabajo. Sin embargo, con *Lb. reuteri* NRRL B-14171 en la fermentación de leche junto con *S. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*, se detectaron recuentos más bajos tanto del CLC como de *Lb. reuteri* respecto de nuestros experimentos (Mani-López y col., 2014). La adición de *Lb. reuteri* productores de reuterina no dio lugar a cambios significativos en el pH de los productos elaborados. Nuestros resultados demuestran por primera vez la producción de reuterina *in situ* en productos lácteos tras la adición de la cepa productora y glicerol. El empleo de *Lb. reuteri* junto con glicerol a la leche representa una interesante estrategia antimicrobiana en productos lácteos, ya que la reuterina alcanza la concentración suficiente para ejercer su poder inhibitorio frente a bacterias patógenas (Stevens y col., 2011). De acuerdo con el trabajo de Lüthi-Peng y col. (2002), la reuterina se considera estable a 4 °C en leche disminuyendo su estabilidad al aumentar la temperatura. Se ha descrito una disminución en la concentración de reuterina durante el almacenamiento a 10 °C en cuajada con reuterina (2 UA/ml) como bioconservante (Arqués y col., 2008b). La reuterina tiene un efecto antimicrobiano mayor frente a gram negativos que frente a gram positivos (Arqués y col., 2011). La concentración de reuterina necesaria para inhibir el crecimiento de las BAL es 3 y 5 veces superior a la requerida para inhibir a microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp. (Axelsson y col., 1989; Cleusix y col., 2007). La actividad antimicrobiana de este compuesto depende de las propiedades del alimento, como el pH, la concentración de sal y la temperatura, que deben tenerse en cuenta para optimizar la posible aplicación de este antimicrobiano en el control frente a patógenos. La combinación de la reuterina con otros compuestos como son el ácido láctico y/o el cloruro de sodio puede incrementar su actividad antimicrobiana (El-Ziney y Devebere, 1998; El-Ziney y col., 1999; Rasch y col., 2007). De hecho, se ha demostrado que con una combinación de sal a una concentración elevada, un pH bajo y reuterina, la



inactivación de *Listeria innocua* fue más eficaz que la de reuterina junto con las concentraciones fisiológicas de sal y pH neutro (Rasch y col., 2007).

Con respecto a las características organolépticas de los productos elaborados con *Lb. reuteri* en el presente trabajo no se detectaron olores extraños tras un análisis sensorial preliminar, lo que está en consonancia con otros trabajos consultados.

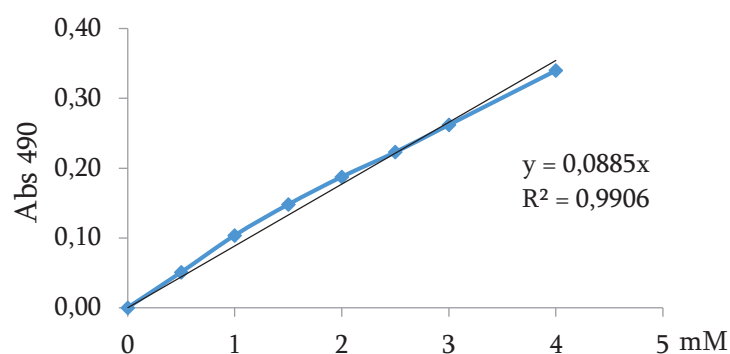
### 3.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA

Con el objetivo de obtener reuterina para analizar su actividad antimicrobiana y estudiar su posible toxicidad, se cultivó *Lb. reuteri* INIA P579 junto con glicerol en anaerobiosis para producir y posteriormente purificar la reuterina.

#### 3.2.1. Producción de reuterina

Para la purificación de reuterina se partió del sobrenadante de 8 litros de *Lb. reuteri* INIA P579 con glicerol. La concentración media de reuterina en el sobrenadante fue de 104,8 mM, calculada mediante el método colorimétrico de Circle y col. (1945) cuantificando según la recta patrón obtenida con distintas concentraciones de acroleína (Fig. 19). Los sobrenadantes se congelaron hasta su purificación.

Figura 19. Recta patrón de acroleína



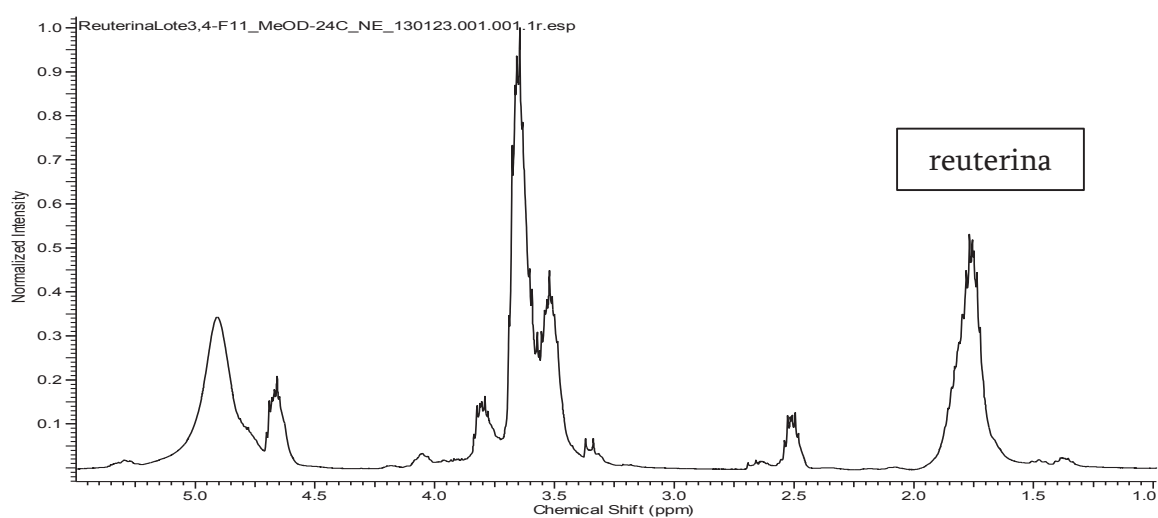
**Tabla 8.** Concentración de reuterina en los sobrenadantes del cultivo de *Lb. reuteri* INIA P579 con 100 mM glicerol

Muestras	Abs 490 nm	Concentración (mM)
L1	0,124	64,14
L2	0,176	91,32
L3	0,244	126,55
L4	0,217	112,76
L5	0,235	121,80
L6	0,224	116,16
L7	0,204	105,69
L8	0,193	99,88

### 3.2.2. Purificación de reuterina

Tras la purificación se obtuvieron 31,86 g de reuterina con un rendimiento de 3,98 g de reuterina pura por litro de solución procesada. La pureza se comprobó por HRESIMS y RMN (Fig. 20), y únicamente las fracciones sin contaminantes (incluyendo glicerol o 1,3-PDO) se utilizaron en los siguientes experimentos. Los niveles de reuterina pura obtenidos resultaron similares a los alcanzados en trabajos anteriores (Vollenweider y col., 2003).

**Figura 20.** Espectro de RMN de la reuterina purificada



### 3.2.3. Cuantificación y actividad antimicrobiana

La concentración molar que se obtuvo del stock de reuterina fue de 1,34 M. Esta concentración se corresponde con una actividad inhibitoria de 660 UA/ml ( $r^2= 0,992$ ), utilizando *E. coli* K12 como microorganismo indicador. La reuterina purificada se resuspendió en agua destilada estéril a una concentración de 100 mg/ml para ser utilizada en los experimentos llevados a cabo en la presente tesis.

## 3.3. TOXICIDAD DE LA REUTERINA

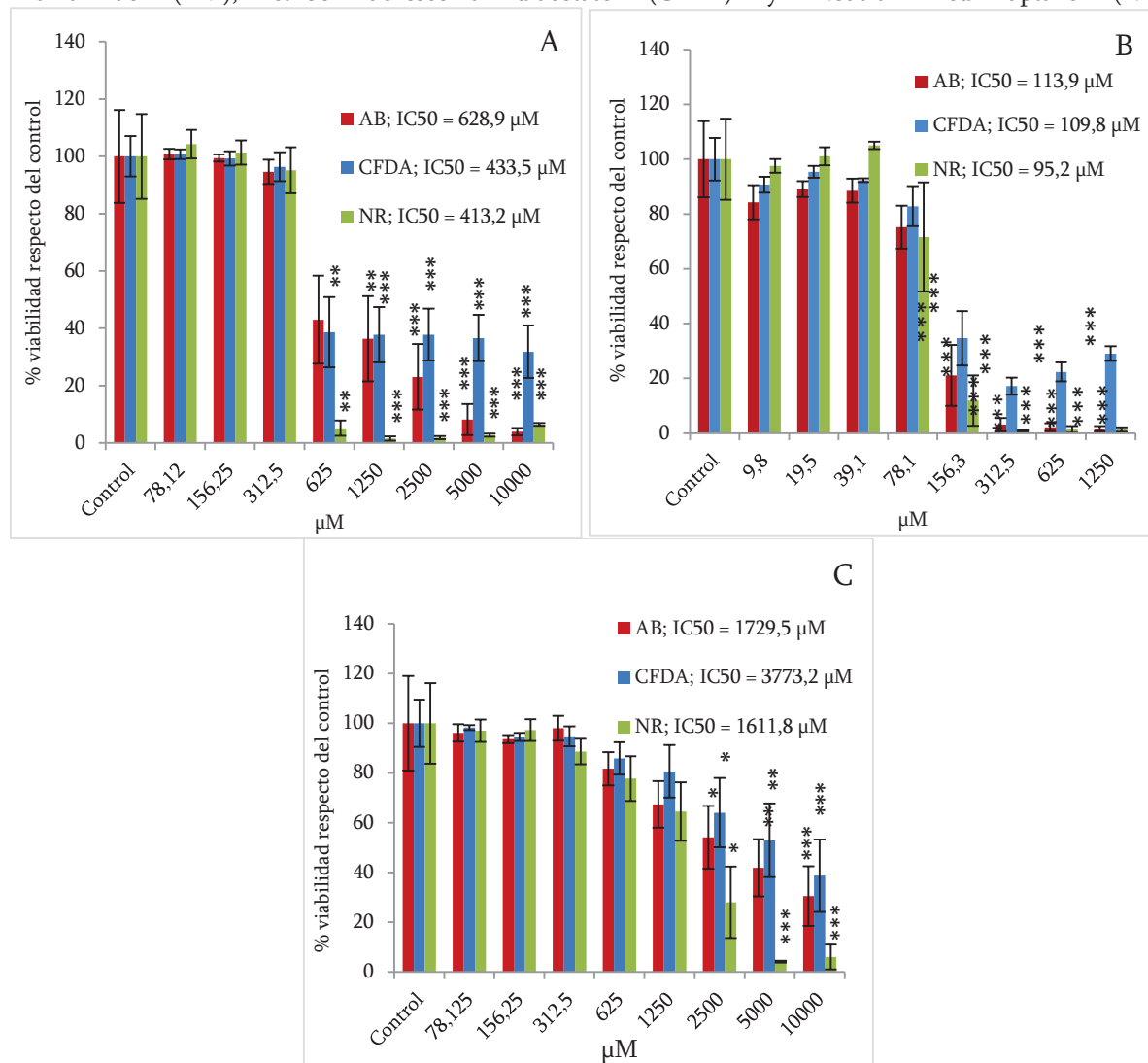
Debido a sus características, la reuterina muestra un alto potencial como bioconservante de amplio espectro. *Lb. reuteri* es considerado un microorganismo seguro, por lo que el empleo de reuterina, ya sea como aditivo alimentario o su producción *in situ* en el alimento, sería más fácilmente aceptado. No obstante, existe información muy limitada sobre la toxicidad de la reuterina, por lo que avances en este aspecto son altamente deseables. En este estudio de toxicidad se incluyen la acroleína, producto de transformación de la reuterina por deshidratación térmica (Vollenweider y Lacroix, 2004) y de toxicidad conocida (Abraham y col., 2011), y el diacetilo (2,3- butanodiona), como compuesto de referencia GRAS producido por BAL y aceptado como ingrediente alimentario (Rincón-Delgadillo y col., 2012).

### 3.3.1. Ensayos de citotoxicidad

Con el fin de no atribuir los efectos tóxicos de la reuterina a la acroleína, se llevó a cabo un estudio sobre la posible deshidratación de la reuterina en las condiciones del ensayo mediante análisis por HPLC a distintos tiempos. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en la concentración de reuterina a lo largo del tiempo de incubación (datos no mostrados). Según Lüthi-Peng y col. (2002) la estabilidad de la reuterina depende de la temperatura, así como de la presencia de azúcares y grupos amino libres del medio, por lo que debe realizarse un estudio individualizado en cada caso.

Los resultados de los estudios de citotoxicidad para reuterina, acroleína y diacetilo realizados con la línea celular Hep G2 se muestran en la Figura 21.

**Figura 21.** Resultados de la citotoxicidad de la reuterina (A), acroleína (B) y diacetilo (C) para los ensayos de AlamarBlue (AM), carboxifluoresceína diacetato (CFDA) y Neutral Red uptake (NR)



Las barras de error representan la media de las tres repeticiones independientes del ensayo y las diferencias significativas respecto al control tienen una significación  $P < 0,05$

La reuterina resultó más tóxica a nivel de los lisosomas (ensayo NRU) que a nivel de actividad mitocondrial (ensayo AB) mostrando una viabilidad inferior al 10% a concentraciones de 625 µM (46,3 µg/ml) y 5000 µM (370,4 µg/ml), respectivamente (Fig. 1A). La acroleína presentó una toxicidad similar respecto a la actividad de los lisosomas y mitocondrial, produciendo más de un 90% de muerte celular a una concentración de 312,5 µM (17,5 µg/ml) (Fig. 1B). Ambos compuestos mostraron un menor efecto tóxico para la

membrana celular (ensayo CFDA-AM). El diacetilo mostró citotoxicidad principalmente a nivel de los lisosomas, con una disminución de más del 90% en la viabilidad celular a concentraciones de 5000  $\mu\text{M}$  (430,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 21C).

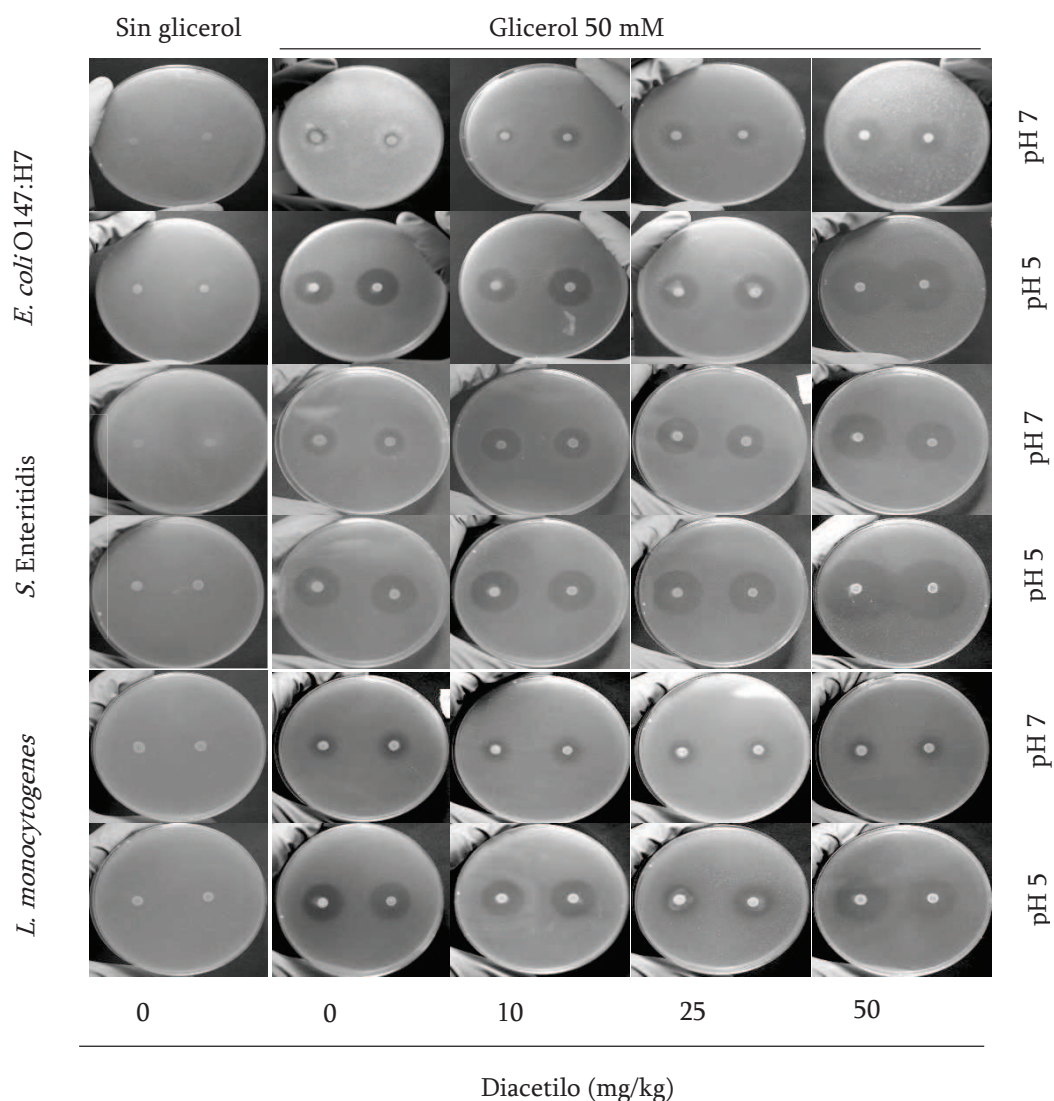
La concentración inhibitoria que produce el 50% de la muerte celular ( $\text{IC}_{50}$ ) de cada compuesto se calculó para cada uno de los tres ensayos (Fig. 21). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos con el ensayo NRU fueron los más bajos, mostrando que los lisosomas fueron los más sensibles a nivel intracelular. Estos resultados indican que la reuterina y la acroleína se muestran 4 y 17 veces más tóxicas que el diacetilo, respectivamente. Chen y col. (2002) determinaron en un cultivo celular murino de fibroblastos 3T3, sin indicar ni el tiempo de exposición, ni la estabilidad de la reuterina durante el periodo de exposición, una  $\text{IC}_{50}$  para la reuterina de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Este resultado es similar al obtenido en nuestros ensayos, donde se obtuvo un valor para la  $\text{IC}_{50}$  de 413,2  $\mu\text{M}$  (30,6  $\mu\text{g/mL}$ ). En los ensayos de la concentración sin efecto observado (NOEC) se calcularon unos valores para la reuterina, acroleína y diacetilo de 312,5, 78,1 y 1250  $\mu\text{M}$ , respectivamente, comparables a los anteriores. De acuerdo con nuestro resultado, podíamos considerar la acroleína como un compuesto de toxicidad elevada, mientras que la reuterina y el diacetilo presentarían un perfil de toxicidad moderado y bajo, respectivamente. Nuestros ensayos están en concordancia con resultados previos *in vivo* para determinar la toxicidad aguda de estos compuestos. La dosis letal para el 50% de la población ( $\text{DL}_{50}$ ) para la acroleína se determinó en ratas, ratones y hamsters a concentraciones de entre 7 y 46 mg/ kg del peso corporal (Gomes y col., 2002). La  $\text{DL}_{50}$  de la reuterina en ratones tras exposición intraperitoneal fue de aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal (Yunmban y Roberts, 1993). Estos autores también estudiaron la posible relación de la acroleína en la toxicidad de la reuterina, observando que en la toxicidad de ésta no había correspondencia con la actividad biológica observada para la acroleína. La toxicidad aguda del diacetilo después de exposición oral en ratas dio lugar a valores de 1580 mg/kg de peso (Diacetyl, MSDS).

### 3.4. EFECTO DE LA REUTERINA Y EL DIACETILO EN MEDIO DE CULTIVO Y EN LECHE FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS: *L. MONOCYTOGENES*, *S. ENTERITIDIS* Y *E. COLI* O157:H7

#### 3.4.1. Actividad antimicrobiana de la reuterina producida *in situ* en combinación con diacetilo

En el estudio de la reuterina como bioconservante, se investigó en primer lugar la capacidad antimicrobiana de la reuterina junto con el diacetilo y el ácido láctico mediante la técnica de la doble capa descrita por Spinler y col. (2008). Los resultados se recogen en la Figura 22.

**Figura 22.** Halos de inhibición de *Lb. reuteri* INIA 572 (punto izquierdo) e INIA P579 (punto derecho) frente a *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*. Las placas contienen glicerol (50 mM), diacetilo (0-50 mg/kg) y distintos pH (5,0-7,0).



Se comprobó la inhibición de los tres patógenos ensayados por las dos cepas de *Lb. reuteri* productoras de reuterina, efecto que no se registró en las placas sin glicerol o con las cepas de *Lb. reuteri* no productoras. A pH 7,0 las zonas de inhibición producidas por *Lb. reuteri* frente a los gram negativos aumentaron con el incremento de la concentración de diacetilo. Sin embargo, en el caso de *L. monocytogenes* no se observó este resultado. A pH 5,0 los halos fueron mayores frente a los tres patógenos estudiados. La combinación de 50 mg/kg de diacetilo junto con ácido láctico al 10% empleado para conseguir un pH de 5,0 dio lugar a la mayor inhibición.

La capacidad antimicrobiana sinérgica del ácido láctico junto con la reuterina fue descrita por El-Ziney y col. (1999). Sin embargo, no se han encontrado resultados previos sobre la combinación de la reuterina con diacetilo, aunque la capacidad antimicrobiana del diacetilo tanto *in vitro* (Lanciotti y col., 2003; O'Bryan y col., 2009) como en leche (Gupta y col., 1973) y en carne (Kang y col., 1999) es conocida.

#### 3.4.2. Determinación de la cinética de inactivación de la reuterina purificada en combinación con diacetilo

Se utilizó la reuterina purificada a una concentración de 1 y 2 UA/ml, que se corresponden con 2,5 y 5,1 mM, respectivamente en el estudio de las curvas de crecimiento (Fig. 23, 24 y 25) de *E. coli*, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*. Los resultados de la tasa de crecimiento y la fase de latencia se recogen en la Tabla 9. La reuterina a una concentración de 1 UA/ml no fue capaz de inhibir el crecimiento de ninguno de los patógenos. Sin embargo, aumentó significativamente ( $P < 0,01$ ) la fase de latencia de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*. Su combinación con 100 mg/kg de diacetilo incrementó significativamente la duración de la fase de latencia ( $P < 0,01$ ) en comparación con el tratamiento de la reuterina a 1 UA/ml. Este aumento fue más acusado frente a los microorganismos gram negativos, alcanzando esta fase más de 19 h en *S. Enteritidis*.

**Tabla 9.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y fase de latencia ( $\lambda$ ) de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* en presencia de distintas concentraciones de reuterina y diacetilo tras 24 h a 37 °C

Cepa	Parámetro	Diacetilo (mg/kg)	Reuterina (UA/ml)		
			0	1	2
<i>E. coli</i> O157:H7	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0	0,171 <sup>cd</sup>	0,137 <sup>c</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		10	0,164 <sup>cd</sup>	0,140 <sup>c</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		25	0,187 <sup>d</sup>	0,142 <sup>c</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		50	0,126 <sup>c</sup>	0,145 <sup>c</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		100	0,070 <sup>b</sup>	0,064 <sup>b</sup>	0,000 <sup>a</sup>
	$\lambda$ (h)	0	1,11 <sup>a</sup>	7,51 <sup>b</sup>	-
		10	1,73 <sup>a</sup>	9,60 <sup>b</sup>	-
		25	1,68 <sup>a</sup>	10,57 <sup>b</sup>	-
		50	1,35 <sup>a</sup>	9,50 <sup>b</sup>	-
		100	1,47 <sup>a</sup>	12,72 <sup>c</sup>	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0	0,110 <sup>bc</sup>	0,102 <sup>bc</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		10	0,119 <sup>bc</sup>	0,055 <sup>ab</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		25	0,075 <sup>b</sup>	0,117 <sup>bc</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		50	0,148 <sup>c</sup>	0,059 <sup>ab</sup>	0,000 <sup>a</sup>
		100	0,097 <sup>bc</sup>	0,090 <sup>bc</sup>	0,000 <sup>a</sup>
	$\lambda$ (h)	0	1,74 <sup>a</sup>	12,01 <sup>b</sup>	-
		10	1,70 <sup>a</sup>	13,37 <sup>b</sup>	-
		25	1,99 <sup>a</sup>	14,10 <sup>b</sup>	-
		50	2,36 <sup>a</sup>	14,79 <sup>b</sup>	-
		100	4,43 <sup>a</sup>	19,38 <sup>c</sup>	-
<i>L. monocytogenes</i>	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0	0,147 <sup>e</sup>	0,116 <sup>abc</sup>	0,070 <sup>b</sup>
		10	0,114 <sup>bcde</sup>	0,104 <sup>bcde</sup>	0,002 <sup>a</sup>
		25	0,126 <sup>de</sup>	0,093 <sup>bcd</sup>	0,007 <sup>a</sup>
		50	0,117 <sup>cde</sup>	0,104 <sup>abcd</sup>	0,003 <sup>a</sup>
		100	0,111 <sup>bcde</sup>	0,102 <sup>bcde</sup>	0,077 <sup>bc</sup>
	$\lambda$ (h)	0	5,17 <sup>a</sup>	7,60 <sup>cd</sup>	20,42 <sup>f</sup>
		10	6,25 <sup>abc</sup>	7,93 <sup>de</sup>	21,69 <sup>f</sup>
		25	5,92 <sup>ab</sup>	8,42 <sup>de</sup>	21,67 <sup>f</sup>
		50	6,30 <sup>abc</sup>	8,19 <sup>de</sup>	20,63 <sup>f</sup>
		100	6,70 <sup>bcd</sup>	9,15 <sup>e</sup>	20,30 <sup>f</sup>

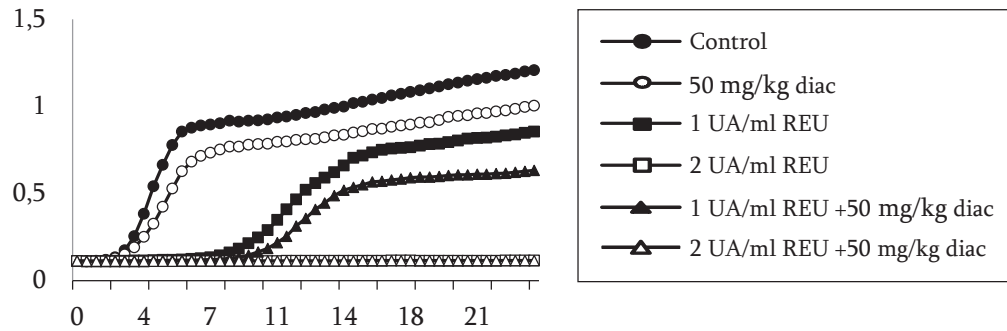
<sup>a-f</sup>. Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) dentro del mismo parámetro

El tratamiento con diacetilo a una concentración de 100 mg/kg disminuyó ( $P < 0,01$ ) la tasa de crecimiento en *E. coli* O157:H7, mientras que *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* no se vieron afectadas por este antimicrobiano aplicado individualmente. La tasa máxima de crecimiento se redujo significativamente ( $P < 0,01$ ) únicamente frente a *E. coli* O157:H7 al combinar la reuterina a 1 UA/ ml con 100 mg/kg de diacetilo. La adición de 2 UA/ml de reuterina inactivó el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* durante las 24 h estudiadas. Sin embargo, *L. monocytogenes* comenzó a crecer a las 20 h. La combinación

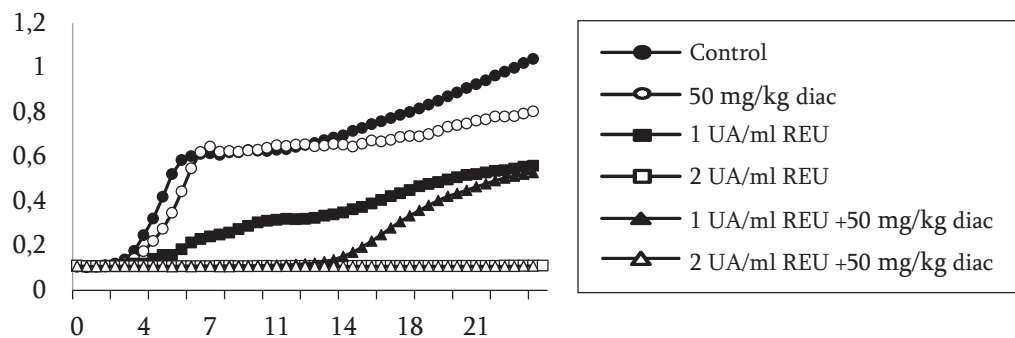


de 2 UA/ml de reuterina con diacetilo no incrementó el efecto antimicrobiano de la reuterina.

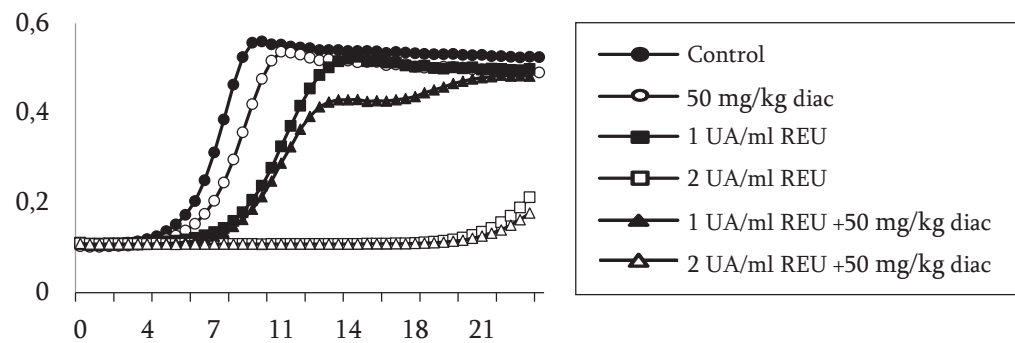
**Figura 23.** Curva de crecimiento de *E. coli* O157:H7 con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo



**Figura 24.** Curva de crecimiento de *S. Enteritidis* con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo



**Figura 25.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* con distintas concentraciones de reuterina y 50 mg/kg de diacetilo



### 3.4.3. Actividad antimicrobiana en leche de la reuterina purificada y el diacetilo frente a microorganismos patógenos

Se estudió en leche el poder antimicrobiano de la reuterina purificada junto con el diacetilo a pH ácido y a pH normal. Los recuentos de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* resultaron significativamente ( $P < 0,01$ ) afectados por los tratamientos y por el tiempo de incubación (Tabla 10).

**Tabla 10.** Recuentos (log ufc/ml) de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* en leche con reuterina (1 UA/ml) en combinación con distintas concentraciones de diacetilo (0-250 mg/kg) a pH normal de la leche y a pH ácido (5,0) tras 6 y 24 h de incubación a 37 °C

pH	Reuterina	Diacetilo	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Enteritidis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
			6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
pH leche	-	0	6,36 <sup>g</sup>	8,90 <sup>d</sup>	6,01 <sup>d</sup>	8,77 <sup>fg</sup>	5,30 <sup>d</sup>	7,95 <sup>f</sup>
	-	10	6,20 <sup>fg</sup>	8,89 <sup>d</sup>	5,94 <sup>d</sup>	8,80 <sup>g</sup>	5,18 <sup>cd</sup>	7,90 <sup>f</sup>
	-	25	6,03 <sup>fg</sup>	8,89 <sup>d</sup>	5,94 <sup>d</sup>	8,86 <sup>g</sup>	5,13 <sup>cd</sup>	7,79 <sup>ef</sup>
	-	50	5,64 <sup>efg</sup>	8,88 <sup>d</sup>	5,54 <sup>d</sup>	8,75 <sup>fg</sup>	4,94 <sup>bcd</sup>	7,79 <sup>ef</sup>
	-	100	4,59 <sup>defg</sup>	8,82 <sup>d</sup>	4,8 <sup>cd</sup>	8,79 <sup>g</sup>	4,09 <sup>b</sup>	7,56 <sup>def</sup>
	-	250	2,19 <sup>a</sup>	1,79 <sup>a</sup>	3,16 <sup>bc</sup>	6,23 <sup>cd</sup>	2,85 <sup>a</sup>	4,15 <sup>ab</sup>
	+	0	3,41 <sup>abcd</sup>	7,44 <sup>d</sup>	3,11 <sup>bc</sup>	7,70 <sup>efg</sup>	4,87 <sup>bcd</sup>	7,56 <sup>def</sup>
	+	10	3,56 <sup>abcd</sup>	7,59 <sup>d</sup>	3,16 <sup>bcd</sup>	7,91 <sup>efg</sup>	4,66 <sup>bcd</sup>	7,49 <sup>def</sup>
	+	25	3,39 <sup>abcd</sup>	7,23 <sup>cd</sup>	3,09 <sup>bc</sup>	7,72 <sup>efg</sup>	4,59 <sup>bcd</sup>	7,39 <sup>def</sup>
	+	50	3,27 <sup>abcd</sup>	6,67 <sup>cd</sup>	3,09 <sup>bc</sup>	5,41 <sup>bc</sup>	4,33 <sup>bc</sup>	7,30 <sup>def</sup>
	+	100	3,15 <sup>abcd</sup>	4,71 <sup>ef</sup>	2,93 <sup>abc</sup>	4,88 <sup>b</sup>	4,01 <sup>b</sup>	6,88 <sup>cdef</sup>
pH ácido (5,0)	-	0	4,53 <sup>cdef</sup>	8,22 <sup>d</sup>	1,50 <sup>ab</sup>	7,70 <sup>efg</sup>	2,68 <sup>a</sup>	5,95 <sup>bcde</sup>
	-	10	4,08 <sup>bcde</sup>	8,07 <sup>d</sup>	2,03 <sup>ab</sup>	7,66 <sup>efg</sup>	2,63 <sup>a</sup>	5,95 <sup>bcde</sup>
	-	25	4,69 <sup>defg</sup>	8,14 <sup>d</sup>	2,18 <sup>ab</sup>	7,75 <sup>efg</sup>	2,51 <sup>a</sup>	5,98 <sup>bcde</sup>
	-	50	4,46 <sup>cdef</sup>	8,20 <sup>d</sup>	2,24 <sup>ab</sup>	7,42 <sup>def</sup>	2,52 <sup>a</sup>	5,72 <sup>abcd</sup>
	-	100	3,76 <sup>abcd</sup>	7,50 <sup>d</sup>	1,78 <sup>ab</sup>	6,65 <sup>cde</sup>	2,40 <sup>a</sup>	5,33 <sup>abc</sup>
	+	0	2,14 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>	1,81 <sup>ab</sup>	0,45 <sup>a</sup>	2,29 <sup>a</sup>	4,73 <sup>ab</sup>
	+	10	2,05 <sup>a</sup>	2,16 <sup>ab</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	2,32 <sup>a</sup>	4,98 <sup>abc</sup>
	+	25	2,25 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	2,55 <sup>a</sup>	5,16 <sup>abc</sup>
	+	50	2,70 <sup>a</sup>	2,32 <sup>ab</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>	4,91 <sup>ab</sup>
	+	100	2,26 <sup>abc</sup>	1,95 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	2,29 <sup>a</sup>	3,61 <sup>a</sup>

<sup>a-g</sup>. Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) dentro del mismo parámetro

Al pH de la leche, tras 6 h de incubación, la reuterina mostró un efecto bacteriostático sobre los microorganismos gram negativos, que fue menor frente a *L. monocytogenes*. Después de 24 h, los recuentos de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* fueron de 1,46, 1,07 y 0,39 u. log menores que en la leche control, respectivamente. Los recuentos con diacetilo añadido individualmente, disminuyeron ( $P$

< 0,01) únicamente con 250 mg/kg, con valores de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* 4,17, 2,85 y 2,45 u. log menores que los registrados en la leche control a las 6 h a 37 °C y 7,11, 2,54 y 3,80 u. log menores a las 24 h a 37 °C. Se observó un efecto antimicrobiano sinérgico con la combinación de reuterina y diacetilo frente a los tres patógenos estudiados. La combinación de 1 UA/ml de reuterina con 50 ó 100 mg/kg de diacetilo disminuyó de manera sinérgica los recuentos de *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 tras 24 h a 37 °C, mientras que frente a *L. monocytogenes* no se observó incremento de la actividad antimicrobiana respecto a los tratamientos individuales. A pH 5,0 se detectó un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* a las 24 h de estudio consiguiendo niveles 2 u. log menores que en las muestras de leche control. El efecto combinado del pH ácido y la reuterina resultó bactericida tras 6 h de incubación en los tres patógenos. Después de 24 h, los recuentos de *E. coli* y *S. Enteritidis* disminuyeron hasta valores de 1,68 y 0,45 u. log, respectivamente, mientras que *L. monocytogenes* reinició su crecimiento hasta alcanzar 4,73 u. log. No se registró efecto bactericida aditivo en presencia de diacetilo con ninguna de las concentraciones ensayadas, excepto en los recuentos de *L. monocytogenes*, que resultaron 1,12 u. log más bajos en leche a pH ácido con 100 mg/kg de diacetilo y 1 UA/ml de reuterina, comparándolo con los niveles obtenidos al añadir solo reuterina a la leche acidificada.

Nuestros resultados están en concordancia con los estudios previos que demuestran que tanto el diacetilo como la reuterina son más eficaces frente a patógenos gram negativos que frente a gram positivos (Jay, 1982; Arqués y col., 2011; Stevens y col., 2011). Las tasas más altas de inhibición conseguidas por la reuterina en combinación con el diacetilo, pH bajo o ambos, resultan de interés especialmente en productos lácteos fermentados por su pH ácido y la formación de diacetilo durante la fermentación. Muchas variedades de queso y leches fermentadas presentan un pH de 5,0 o incluso inferior. El diacetilo se comporta como antimicrobiano en concentraciones de 300 a 10000 mg/kg frente a *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* (Jay, 1982; Olasupo y col., 2003; O'Bryan y col., 2009). No obstante, en nuestro trabajo se detecta actividad antimicrobiana a una concentración de diacetilo de 250 mg/kg y esa concentración se puede reducir a 100 mg/kg cuando este compuesto se

combina con 1 UA/ml de reuterina. Por tanto, la combinación de reuterina con diacetilo permite el uso de ambos bioconservantes a bajas concentraciones, que son las que pueden encontrarse de manera natural en los alimentos. Como se indicó en los apartados anteriores, *Lb. reuteri* INIA P572 e INIA P579 producen reuterina a concentraciones de 2 y 4 UA/ml en queso y yogur. Por otra parte en distintas variedades de queso o productos lácteos se pueden encontrar diferentes concentraciones de diacetilo de 0 a 4.500 mg/kg (Zeppa y col., 2001). Por lo tanto, las cepas productoras de reuterina podrían utilizarse en combinación con diacetilo como ingrediente alimentario, o junto con cepas de *Lactococcus lactis* productoras de diacetilo para lograr la producción continua de los dos bioconservantes en productos lácteos.

La actividad antimicrobiana de la reuterina se atribuye fundamentalmente a su capacidad para reaccionar con grupos sulfhidrilo de aminoácidos, desencadenando una respuesta de estrés oxidativo. La actividad antimicrobiana del diacetilo podría deberse a su reacción con las proteínas que unen arginina inactivando el uso de la arginina por parte de las bacterias gram negativas (Jay, 2005). La adición o la producción *in situ* de ambos bioconservantes por BAL seleccionadas añadidas como adjuntos a los cultivos iniciadores podría considerarse una herramienta atractiva para su aplicación en el control del crecimiento de microorganismos patógenos en productos lácteos.

### 3.5. INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN SALMÓN AHUMADO MEDIANTE BIOCONSERVANTES Y ALTAS PRESIONES

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las altas presiones en combinación con reuterina, SLP y LF en salmón ahumado almacenado en condiciones de refrigeración y de abuso de temperatura.

3.5.1. Efecto frente a *L. monocytogenes*

Con el fin de eliminar la presencia de *L. monocytogenes* en salmón humado, se ha investigado el efecto antimicrobiano de la reuterina y de su combinación con altas presiones. Los niveles de *L. monocytogenes* INIA 2530 en salmón ahumado control y en el producto sometido a los distintos tratamientos con APH (450 MPa/ 5 min), reuterina (8 UA/g) y su combinación durante el almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 11. De acuerdo con los análisis de varianza, los recuentos del patógeno disminuyeron significativamente por las APH ( $P < 0.001$ ) y aumentaron durante el periodo de almacenamiento ( $P < 0.001$ ) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y su combinación almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,25±0,17 <sup>bA</sup>	5,26±0,06 <sup>Ac</sup>	6,47±0,82 <sup>Bd</sup>	7,23±0,23 <sup>Cc</sup>
	REU	5,32±0,06 <sup>bA</sup>	5,17±0,08 <sup>Ac</sup>	5,69±0,39 <sup>Ac</sup>	6,66±0,90 <sup>Bb</sup>
	APH	3,98±0,09 <sup>aA</sup>	4,64±0,10 <sup>Bb</sup>	4,95±0,26 <sup>BbC</sup>	5,54±0,58 <sup>Bc</sup>
	REU+APH	4,22±0,25 <sup>aA</sup>	4,02±0,40 <sup>Aa</sup>	4,15±0,51 <sup>Aa</sup>	4,07±0,63 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	5,33±0,12 <sup>Ab</sup>	6,37±0,31 <sup>Bd</sup>	8,63±0,03 <sup>Cb</sup>	8,40±0,15 <sup>Cb</sup>
	REU	5,22±0,05 <sup>Ab</sup>	5,16±0,03 <sup>Ac</sup>	8,65±0,22 <sup>Cb</sup>	8,27±0,45 <sup>Bb</sup>
	APH	3,98±0,09 <sup>aA</sup>	4,65±0,02 <sup>Bb</sup>	6,14±0,15 <sup>Ca</sup>	7,54±0,08 <sup>Da</sup>
	REU+APH	4,02±0,26 <sup>aA</sup>	3,91±0,43 <sup>Aa</sup>	6,87±1,01 <sup>Ba</sup>	8,12±0,14 <sup>Cb</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* en el salmón ahumado control (5,32 log ufc/g) aumentaron 1,91 y 3,08 u. log durante los 35 d de almacenamiento a 4 y a 10 °C, respectivamente. Un día después del tratamiento, se alcanzaron reducciones significativas ( $P < 0,05$ ) de más de 1 u. log en las muestras tratadas por APH. Sin embargo, la adición de reuterina no disminuyó los recuentos iniciales de este patógeno. El efecto antimicrobiano de las APH a 450 MPa aplicadas individualmente no aumentó cuándo se añadió la reuterina durante las primeras 24 h. Durante el almacenamiento a 4 y 10 °C se observó una recuperación de *L. monocytogenes* en todas las muestras a excepción de las tratadas con la combinación de REU+APH y almacenadas a 4 °C. Las APH disminuyeron la tasa de crecimiento del patógeno manteniendo los niveles cercanos a 6 u. log después de 35 y 21

d de almacenamiento a 4 y 10 °C, respectivamente. Tras 5 semanas de almacenamiento a 4 °C los niveles de *L. monocytogenes* en salmón ahumado tratado con REU+APH fueron 3,16 u. log inferiores a los detectados en el salmón control, ejerciendo por tanto un efecto antimicrobiano sinérgico, ya que se incrementó en más de una unidad logarítmica la suma de la inactivación alcanzada con los tratamientos individuales. Sin embargo, en condiciones de abuso de temperatura (10 °C) el patógeno reinició su crecimiento a partir de los 7 d alcanzando valores similares a los del control sin tratar a los 30 d de almacenamiento.

La presurización del salmón ahumado a 250 MPa durante 20 min no inactivó a *L. monocytogenes*, pero aumentó la fase de latencia de este microorganismo hasta 17 y 10 d a 5 y 10 °C, respectivamente (Lakshmanan y Dalgaard, 2004), mientras que tratamientos más intensos (400–900 MPa) en periodos cortos de tiempo (hasta 60 s) resultaron efectivos en el control de *L. innocua* en salmón ahumado refrigerado (Gudbjornsdottir y col., 2010). En salmón ahumado tratado con 450 MPa/ 10 min se observaron tasas mayores de inactivación de *L. monocytogenes* (Montiel y col., 2012), con un descenso de 2,72 log ufc/g. Durante la refrigeración, a pesar de registrarse una recuperación de *L. monocytogenes*, sus niveles se mantuvieron por debajo de los recuentos iniciales hasta el final del almacenamiento a 5 °C.

En el presente trabajo, la adición de reuterina en la superficie de salmón ahumado retrasó significativamente ( $P < 0.05$ ) el crecimiento de *L. monocytogenes*, a pesar de que el patógeno reiniciase su crecimiento a partir del día 21 a 4 °C. A 10 °C, los recuentos del patógeno se incrementaron en las muestras con reuterina a partir del día 7, alcanzando niveles superiores a 8 u. log sin diferencias significativas respecto al control a partir del día 21. En conclusión podríamos considerar que la actividad de la reuterina (8 UA/g) en salmón ahumado es bacteriostática frente a *L. monocytogenes* durante 21 d a 4 °C y 7 d a 10 °C.

3.5.2. Efecto frente a *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7

Se investigó el efecto de la reuterina así como de otros dos bioconservantes, el sistema lactoperoxidasa y la lactoferrina, en combinación con las altas presiones, frente a los dos patógenos gram negativos estudiados en la presente tesis.

En el salmón ahumado control, los niveles iniciales de *S. Enteritidis* (5,47 log ufc/g) registraron una disminución a lo largo de los 35 d de almacenamiento de 0,74 y 1,09 u. log a 4 y 10 °C, respectivamente (Tabla 12).

**Tabla 12.** Recuentos de *S. Enteritidis* (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,99±0,36 <sup>Bb</sup>	5,72±0,03 <sup>Bb</sup>	5,61±0,07 <sup>ABc</sup>	5,25±0,16 <sup>Ac</sup>
	REU	5,91±0,28 <sup>Bb</sup>	5,59±0,21 <sup>ABb</sup>	5,58±0,17 <sup>ABb</sup>	5,33±0,25 <sup>Ac</sup>
	SLP	5,63±0,08 <sup>Bb</sup>	5,63±0,11 <sup>Bb</sup>	5,37±0,47 <sup>Bb</sup>	3,93±0,57 <sup>Ab</sup>
	LF	5,47±0,31 <sup>Ab</sup>	5,75±0,09 <sup>Ab</sup>	5,23±0,26 <sup>Ab</sup>	5,40±1,21 <sup>Ac</sup>
	APH	2,00±0,00 <sup>Ac</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	1,50±0,58 <sup>Aa</sup>	1,50±0,58 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	1,98±1,13 <sup>Aa</sup>	1,74±0,85 <sup>Aa</sup>	1,65±0,75 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	6,30±0,07 <sup>Bb</sup>	6,34±0,14 <sup>Bb</sup>	6,04±0,07 <sup>Bc</sup>	5,21±0,22 <sup>Ac</sup>
	REU	5,74±0,22 <sup>Ab</sup>	5,75±0,11 <sup>Ac</sup>	5,56±0,03 <sup>Ab</sup>	5,63±0,12 <sup>Ad</sup>
	SLP	5,81±0,12 <sup>BCb</sup>	5,46±0,17 <sup>Bb</sup>	6,01±0,48 <sup>Cc</sup>	4,21±0,00 <sup>Ab</sup>
	LF	5,82±0,47 <sup>ABb</sup>	5,90±0,16 <sup>Bc</sup>	5,58±0,14 <sup>ABb</sup>	5,31±0,21 <sup>Ac</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	1,85±0,98 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	1,89±1,03 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

A las 24 h del tratamiento de APH, los recuentos de *S. Enteritidis* se redujeron hasta valores próximos a 2 u. log. Sin embargo, la adición de REU, SLP o LF no afectó a la población del patógeno. Durante la refrigeración, los niveles del patógeno disminuyeron en todas las muestras, con mayores reducciones en el salmón tratado con el SLP. Con las APH, los niveles de *S. Enteritidis* se mantuvieron por debajo a partir de los 7 d y durante todo el tiempo de almacenamiento por debajo del límite de detección (1 u. log) a las dos temperaturas de estudio.

Con los tratamientos combinados de REU, SLP y LF con las APH, los recuentos de *S. Enteritidis* a partir del día 1 se situaron por debajo de 2 log ufc/g (Tabla 12). Durante el periodo de almacenamiento los valores obtenidos con los tratamientos combinados de REU+APH tanto a 4 como a 10 °C disminuyeron de manera significativa ( $P < 0,05$ ) respecto al control desde el día 1 con recuentos por debajo de 1 u. log desde los 21 d a 4 °C y los 7 d a 10 °C. Los recuentos del patógeno con el tratamiento combinado de SLP+APH se mantuvieron todo el periodo estudiado a las dos temperaturas de almacenamiento por debajo de 1 u. log. Con el tratamiento de LF+APH la inactivación fue menor con recuentos inferiores a 1 u. log a los 35 d a 4 °C y la inactivación fue menor a los 35 d a 4°C a partir del día 7 en salmón almacenado a 10 °C.

Los recuentos de *E. coli* O157:H7 en salmón ahumado tratado con REU, SLP y LF en combinación con las APH disminuyeron de manera significativa ( $P < 0,05$ ) tras los 35 d de almacenamiento a 4 y a 10 °C (Tabla 13).

**Tabla 13.** Recuentos de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,00±0,21 <sup>Cc</sup>	4,64±0,42 <sup>BCc</sup>	4,25±0,27 <sup>Bd</sup>	3,64±0,33 <sup>Ae</sup>
	REU	4,86±0,43 <sup>Bc</sup>	4,40±0,10 <sup>ABc</sup>	4,30±0,01 <sup>ABd</sup>	3,81±0,44 <sup>Ae</sup>
	SLP	4,85±0,19 <sup>Bc</sup>	4,13±0,27 <sup>Bbc</sup>	3,31±0,61 <sup>Ac</sup>	3,34±0,05 <sup>Ade</sup>
	LF	5,07±0,09 <sup>Cc</sup>	4,41±0,23 <sup>ABc</sup>	4,83±0,39 <sup>BCd</sup>	4,07±0,10 <sup>Ae</sup>
	APH	1,73±0,26 <sup>Aab</sup>	2,40±0,52 <sup>Ba</sup>	2,41±0,33 <sup>Bb</sup>	1,90±0,09 <sup>ABbc</sup>
	REU+APH	1,43±0,11 <sup>ABa</sup>	2,05±0,77 <sup>Ba</sup>	1,74±0,07 <sup>ABb</sup>	1,00±0,78 <sup>Ab</sup>
	SLP+APH	1,55±0,35 <sup>Ba</sup>	1,60±0,22 <sup>Ca</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	2,19±0,62 <sup>Ab</sup>	3,47±0,05 <sup>Bb</sup>	3,30±0,29 <sup>Bc</sup>	2,60±0,15 <sup>Ac</sup>
10 °C	Control	5,14±0,09 <sup>Bd</sup>	4,40±0,29 <sup>Ba</sup>	4,47±0,05 <sup>Ad</sup>	4,51±0,13 <sup>Ae</sup>
	REU	4,93±0,11 <sup>Ccd</sup>	4,38±0,17 <sup>Bb</sup>	4,31±0,05 <sup>Bd</sup>	3,96±0,13 <sup>Ade</sup>
	SLP	4,56±0,13 <sup>Bc</sup>	4,11±0,21 <sup>ABb</sup>	3,67±0,56 <sup>Ac</sup>	3,71±0,39 <sup>Ad</sup>
	LF	5,17±0,03 <sup>Bd</sup>	4,49±0,43 <sup>Ab</sup>	4,34±0,08 <sup>Ad</sup>	4,35±0,02 <sup>Ade</sup>
	APH	1,80±0,32 <sup>Ab</sup>	2,25±0,63 <sup>Aa</sup>	2,40±0,28 <sup>Ab</sup>	2,25±0,47 <sup>Ab</sup>
	REU+APH	1,73±0,09 <sup>Ab</sup>	2,16±0,47 <sup>ABa</sup>	1,89±0,08 <sup>Ab</sup>	2,35±0,20 <sup>Bbc</sup>
	SLP+APH	1,38±0,42 <sup>Aa</sup>	1,47±0,38 <sup>Aa</sup>	1,14±0,20 <sup>Aa</sup>	1,33±0,67 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	2,78±1,09 <sup>Ab</sup>	4,07±0,50 <sup>Cb</sup>	3,79±0,34 <sup>Cc</sup>	2,97±0,30 <sup>Bc</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.



Asimismo, durante la refrigeración a 4 y 10 °C los niveles iniciales de *E. coli* O157:H7 (5,28 log ufc/g) disminuyeron en el producto. Un día después de los tratamientos, los niveles de *E. coli* O157:H7 en las muestras presurizadas se redujeron hasta valores inferiores a 2 u. log., mientras que no se observaron cambios con REU y LF añadidos individualmente. En presencia del SLP, los niveles del patógeno disminuyeron ligeramente durante la refrigeración tanto a 4 como a 10 °C desde los 7 a los 35 d. Con los tratamientos combinados la actividad antimicrobiana se incrementó considerablemente. La combinación de SLP+APH fue la más eficaz frente al patógeno, con recuentos por debajo del límite de detección (1 u. log) desde 21d a 4 °C y sin superar las 1,5 u. log a lo largo del periodo de almacenamiento a 10 °C. Las muestras tratadas con REU+APH a 4 °C presentaron diferencias en los recuentos de *E. coli* superiores a 2,5 u. log a lo largo las 5 semanas con respecto al salmón ahumado control con valores de 1 u. log a los 35 d. A 10 °C la tendencia fue similar, aunque a los 35 d se registró una recuperación celular mayor, con recuentos de 2,35 u. log. Con el tratamiento combinado de LF+APH los niveles de *E. coli* fueron más altos que con las APH aplicadas individualmente.

En el presente trabajo se propone una combinación de barreras para evitar la recuperación de los patógenos gram negativos, asegurando la seguridad y calidad del salmón ahumado. El tratamiento combinado de las APH junto con bioconservantes resulta eficaz para combatir la recuperación de las células dañadas por la aplicación individual de uno de los dos tratamientos, evitando el restablecimiento del crecimiento durante la refrigeración (Garriga y col., 2002). Existen en la bibliografía numerosos estudios de las APH combinadas con lactatos o bacteriocinas, (Kalchayanand y col., 2004; Jofré y col., 2008; De Alba y col., 2013), pero escasos al combinar APH, SLP y LF (Montiel y col., 2012).

La actividad antimicrobiana de la reuterina ha sido demostrada frente a diversos microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. En leche resultó bactericida frente a *E. coli* O157:H7 a 4 °C y *S. Enteritidis*, aunque en el presente trabajo no hemos registrado dicha actividad. Esta diferencia podría atribuirse al bajo contenido de agua en el salmón o a una distribución irregular de la reuterina en el producto. Las APH mantuvieron los niveles de *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 por debajo de 1 y 2 u. log a los

35 d a 4 °C. La baja  $a_w$  o el alto contenido en sal podrían reforzar la eficacia antimicrobiana del tratamiento, evitando la recuperación de las células dañadas (Arqués y col., 2008). Sin embargo, en este trabajo no se vio incrementado el efecto inhibitorio sobre estos patógenos al aplicar reuterina junto con las APH. Este efecto antimicrobiano sinérgico de la reuterina y las APH se observó previamente en salmón ahumado frente a *L. monocytogenes*.

El SLP tiene un efecto demostrado bactericida y bacteriostático frente a patógenos alimentarios en leche (Siragusa y Johnson, 1989), carne (Elliot y col., 2004) y salmón ahumado (Montiel y col., 2012). En este trabajo se registró un efecto bactericida frente a *S. Enteritidis* y *E. coli* cuando se añadieron 2,8 UA/g al salmón tanto a 4 como a 10 °C. La combinación de SLP y APH resultó más eficaz que la mezcla de APH con lisozima, nisina y otras bacteriocinas en caldo (García-Graells y col., 2003). En este estudio, en las muestras presurizadas y con el SLP se mantuvieron los recuentos de *S. Enteritidis* y *E. coli* por debajo de 1 u. log y 1,7 u. log, respectivamente, durante las 5 semanas de almacenamiento a las dos temperaturas estudiadas. El daño causado en la membrana celular por las APH podría facilitar la entrada de SLP dentro de la célula, inhibiendo enzimas implicados en el metabolismo, la síntesis de ADN y ARN y la cadena respiratoria, disminuyendo así la habilidad de los patógenos de poder recuperarse (Naidu, 2000).

El efecto antimicrobiano de la LF que se ha demostrado en medio de cultivo es más limitado en alimentos debido a la complejidad de las matrices alimentarias. La presencia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), puede inhibir su efecto antimicrobiano, debido a su posible interacción con otras moléculas (García-Graells y col., 2003; Del Olmo y col., 2012a). Del Olmo y col. (2010) demostraron su poder antimicrobiano *in vitro* frente a tres cepas de *S. Enteritidis* a unas concentraciones entre 5-20 mg/ml. Sin embargo, no se demostró actividad frente a *E. coli* O157:H7 en filetes de pollo almacenados a 5 °C (Del Olmo y col., 2012b), siendo nuestros resultados similares ya que no se observó efecto antimicrobiano en salmón ahumado frente a *S. Enteritidis* ni *E. coli* O157:H7. A diferencia del potencial limitado de LF como agente antimicrobiano en alimentos, algunos autores han señalado que su combinación con las APH refuerza ligeramente el efecto bactericida de las APH aplicadas de manera individual frente a *E. coli* O157:H7 (Del Olmo y col.,

2012b). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados no se incrementó el efecto antimicrobiano tras aplicar 450 MPa/ 5 min junto con LF en el crecimiento de los gram negativos estudiados en salmón ahumado.

El SLP fue bactericida frente a los dos patógenos, y las APH mantuvieron los niveles de *S. Enteritidis* y *E. coli* por debajo de 2 log cfu/g en el salmón ahumado refrigerado a 4 °C, situándose en *Salmonella* por debajo del límite de detección. La actividad de las APH frente a *E. coli* O157:H7 aumentó en combinación con el SLP a 4 °C y evitó su recuperación a 10 °C.

### 3.5.3. Efecto sobre los microorganismos totales

Los niveles de microorganismos totales presentes (TVC del inglés total-viable-counts) en el salmón ahumado tratado con REU en combinación con las APH se recogen en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Recuentos de microorganismos totales (log ufc/g) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	2,52±0,29 <sup>Ab</sup>	5,36±0,35 <sup>Bb</sup>	7,19±0,13 <sup>Cd</sup>	8,29±0,74 <sup>Db</sup>
	REU	2,00±0,07 <sup>Bb</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	3,63±0,23 <sup>Cb</sup>	5,36±0,11 <sup>Dab</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	4,68±0,12 <sup>Bc</sup>	5,45±0,69 <sup>Bab</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	3,37±4,15 <sup>Ba</sup>
10 °C	Control	3,08±0,39 <sup>Ac</sup>	6,3±0,06 <sup>Bb</sup>	8,49±1,01 <sup>Cc</sup>	8,45±0,43 <sup>Cb</sup>
	REU	2,08±0,65 <sup>Bb</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	8,68±0,53 <sup>Cc</sup>	8,35±0,85 <sup>Cb</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	6,80±0,45 <sup>Bb</sup>	7,24±1,15 <sup>Bb</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	2,83±0,15 <sup>Ba</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los recuentos iniciales de TVC (0 h) en el salmón ahumado control fueron de 2,49 log ufc/g. En las muestras control, los TVC se incrementaron en más de 5 u. log durante los 35 d de refrigeración. De acuerdo con el análisis de la varianza los recuentos disminuyeron de manera significativa ( $P < 0,001$ ) por el tratamiento y aumentaron ( $P < 0,001$ ) durante el periodo de almacenamiento. A las 24 h, tanto a 4 como a 10 °C el

tratamiento de las APH y el combinado con reuterina disminuyeron ( $P < 0,05$ ) los recuentos, que se mantuvieron por debajo de 10 log ufc/g. A los 7 d, los recuentos de las muestras tratadas se mantuvieron por debajo de 1 u. log. Durante la refrigeración se registró una recuperación de los microorganismos totales en las muestras tratadas con reuterina, aunque los recuentos a los 35 d fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) inferiores que en el salmón control a 4 °C, con valores inferiores a 6 u. log. En condiciones de abuso de temperatura, se observó una recuperación hasta valores similares al control desde el día 21 hasta el final del experimento. El tratamiento de las APH disminuyó los TVC hasta el día 7 a 4 y 10 °C, observándose una recuperación los días 21 y 35. La combinación de REU+APH aplicada en salmón ahumado mantuvo los recuentos por debajo de 1 u. log hasta los 21 d, que aumentaron hasta alcanzar a los 35 d concentraciones de 3,37 y 2,83 u. log a 4 y 10 °C, respectivamente.

En la microbiota inicial presente en el salmón ahumado suelen dominar las levaduras y las bacterias gram negativas, mientras que al final de su vida útil destacan las bacterias ácido lácticas frente a otros grupos microbianos (Tahiri y col., 2009). La susceptibilidad de las bacterias gram negativas a las APH (Linton y col., 2003) podría explicar los bajos recuentos detectados en las muestras presurizadas durante la primera semana. La presurización del salmón ahumado a 450 MPa durante 5 min retrasó el crecimiento de los TVC durante su almacenamiento en refrigeración, con recuentos por debajo de las 6 log ufc/g a los 35 d y 4 °C. En otros estudios en salmón ahumado ya se observaron resultados similares (Lakshmanan y Dalgaard, 2004; Medina y col., 2009; Montiel y col., 2012). El efecto antimicrobiano de la reuterina no había sido estudiado en el control de microorganismos alterantes en productos de la pesca. Desde un punto de vista microbiológico, la vida útil del pescado se considera que finaliza cuándo se alcanzan unos niveles de bacterias superiores a  $10^7$  log ufc/g (ICMSF, 1986). De acuerdo con nuestros resultados, la reuterina retrasó el crecimiento de la microbiota presente en el salmón ahumado, manteniendo los niveles de los TVC por debajo de 7 u. log durante 35 d a 4°C y 21 d a 10 °C, extendiendo la vida útil del producto.

El efecto antimicrobiano de las APH se incrementó ( $P < 0,05$ ) cuando se añadió reuterina, con niveles de TVC por debajo de los detectables a los 21 d de almacenamiento tanto a 4 como a 10 °C. Ambos tratamientos pueden ser aplicados en combinación para aumentar el periodo de vida útil del salmón ahumado a temperaturas de refrigeración, mostrando un fuerte efecto sinérgico. Más concretamente, el efecto del tratamiento combinado consiguió prolongar la vida útil al menos 15 y 35 d a 4 y 10 °C, respectivamente.

#### 3.5.4. Efecto en las características del salmón ahumado

##### 3.5.4.1. pH y $a_w$

Los valores del pH durante el almacenamiento en refrigeración del salmón ahumado control, tratado con REU, APH o la combinación de ambas se recogen en la Tabla 15. Los tratamientos ( $P < 0,001$ ) y el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,001$ ) influyeron de manera significativa sobre el pH del producto. A día 1 del experimento, el pH en el salmón ahumado control fue de 6,21 y 6,31 a 4 y 10 °C, respectivamente y en las muestras tratadas con REU, APH o su combinación, el pH se situó en valores entre 6,21 y 6,40. Al final del almacenamiento los valores de la muestra control disminuyeron hasta 5,77 y 5,44 a 4 y 10 °C, respectivamente. En el salmón ahumado tratado con REU o APH los valores de pH no variaron significativamente respecto al control, aunque fueron más altos, mientras que con el tratamiento combinado se evitó el descenso, con valores similares a los iniciales de 6,25 después de 35 d tanto a 4 como a 10 °C. En el salmón ahumado control y en el tratado con REU o APH de manera individual, el descenso de pH es debido probablemente a los microorganismos alterantes. La combinación de REU y APH previene el crecimiento de esas bacterias y por lo tanto el descenso del pH.

**Tabla 15.** Valores de pH en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	21 d	35 d
4 °C	Control	6,21±0,03 <sup>Ba</sup>	6,21±0,11 <sup>Bb</sup>	5,77±0,07 <sup>Aa</sup>
	REU	6,21±0,08 <sup>Ba</sup>	5,86±0,11 <sup>Ac</sup>	5,86±0,08 <sup>Aab</sup>
	APH	6,32±0,02 <sup>ABb</sup>	6,61±0,06 <sup>Ba</sup>	6,02±0,36 <sup>Aab</sup>
	REU+APH	6,37±0,03 <sup>Bb</sup>	6,54±0,06 <sup>Cc</sup>	6,25±0,04 <sup>Ab</sup>
10 °C	Control	6,31±0,02 <sup>Cab</sup>	5,84±0,18 <sup>Ba</sup>	5,44±0,06 <sup>Aa</sup>
	REU	6,25±0,04 <sup>Ba</sup>	5,93±0,04 <sup>Aa</sup>	5,95±0,07 <sup>Ab</sup>
	APH	6,40±0,01 <sup>Bb</sup>	6,58±0,05 <sup>Cb</sup>	6,10±0,14 <sup>Abc</sup>
	REU+APH	6,29±0,10 <sup>Aab</sup>	6,55±0,02 <sup>Bb</sup>	6,25±0,02 <sup>Ac</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de  $a_w$  durante el almacenamiento en refrigeración del salmón ahumado control, tratado con REU, APH o la combinación de ambas se muestran en la Tabla 16. Los tratamientos ( $P < 0,001$ ) influyeron de manera significativa en los valores de este parámetro. En el día 1, los valores de  $a_w$  en el salmón ahumado control fueron 0,930 y 0,927, a 4 y 10 °C, respectivamente. Cuando se añadió REU de manera individual o combinada con las APH se observaron valores superiores ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, al final de la refrigeración los valores de  $a_w$  en el salmón ahumado tratado con APH o reuterina no se diferenciaron del control, mientras que se detectaron valores más altos en las muestras tratadas con APH y mantenidas en condiciones de abuso de temperatura (10 °C) aunque las diferencias máximas registradas fueron únicamente de 0,006 unidades. Este incremento también se había visto en el salmón ahumado presurizado en combinación con SLP (Montiel y col., 2012).

**Tabla 16.** Valores de  $a_w$  en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	21 d	35 d
4 °C	Control	0,930±0,002 <sup>Aab</sup>	0,926±0,012 <sup>Aa</sup>	0,929±0,005 <sup>Aa</sup>
	REU	0,936±0,006 <sup>Abc</sup>	0,935±0,003 <sup>Aa</sup>	0,933±0,006 <sup>Aa</sup>
	APH	0,921±0,006 <sup>Aa</sup>	0,941±0,003 <sup>Ba</sup>	0,936±0,001 <sup>Ba</sup>
	REU+APH	0,941±0,001 <sup>Ac</sup>	0,935±0,007 <sup>Aa</sup>	0,934±0,002 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	0,927±0,002 <sup>Aa</sup>	0,934±0,010 <sup>Aa</sup>	0,934±0,003 <sup>Aa</sup>
	REU	0,938±0,004 <sup>Ab</sup>	0,935±0,005 <sup>Aa</sup>	0,937±0,001 <sup>Aab</sup>
	APH	0,929±0,005 <sup>Aa</sup>	0,927±0,003 <sup>Aa</sup>	0,938±0,001 <sup>Bab</sup>
	REU+APH	0,944±0,001 <sup>Bb</sup>	0,933±0,004 <sup>Aa</sup>	0,940±0,003 <sup>Bb</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

### 3.5.4.2. Textura

Los cambios en la fuerza al corte en salmón ahumado tratado con reuterina, APH o la combinación de ambos se recogen en la Tabla 17. Los tratamientos y el tiempo de almacenamiento afectaron de manera significativa ( $P < 0,05$ ) a la textura del salmón ahumado.

**Tabla 17.** Fuerza al corte (N) en salmón tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

			1 d	35 d
Fuerza al corte (N)	4 °C	Control	11,65±7,58 <sup>Aa</sup>	11,82±3,82 <sup>Aa</sup>
		REU	10,79±1,45 <sup>Aa</sup>	16,26±1,96 <sup>Aab</sup>
		APH	10,50±1,35 <sup>Aa</sup>	12,03±2,53 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	12,36±2,47 <sup>Aa</sup>	18,57±3,84 <sup>Bb</sup>
	10 °C	Control	13,21±3,16 <sup>Aa</sup>	10,93±4,04 <sup>Aa</sup>
		REU	14,76±7,35 <sup>Aa</sup>	15,82±4,30 <sup>Aa</sup>
		APH	9,36±1,80 <sup>Aa</sup>	13,64±6,97 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	13,65±3,57 <sup>Aa</sup>	17,89±7,77 <sup>Aa</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Tras los tratamientos, los valores de fuerza al corte se mantuvieron entre 9,36 y 14,76 N y no se registraron diferencias significativas. Sin embargo, después del almacenamiento durante 35 d los valores se situaron entre 10,93 y 18,57 N, con una

tendencia al aumento en las muestras tratadas con REU, APH y la combinación de ambas respecto al control no tratado.

El efecto de la presurización en las características de textura de los productos de la pesca depende de las propiedades intrínsecas de las especies y del tratamiento aplicado (Gómez-Estaca y col., 2007; Hurtado y col., 2001). En salmón ahumado se ha observado un aumento en la dureza tras la presurización (Lakshmanan y Daalgard, 2004; Montiel y col., 2012), que se ha atribuido a la compactación del músculo (Angsupanich y Ledward, 1998; Gómez-Estaca y col., 2007). En este trabajo no se ha observado un aumento inmediato tras los tratamientos, pero si un incremento en los valores a los 35 d de almacenamiento cuándo se aplicó REU, APH o la combinación de ambos.

#### 3.5.4.3. Color

Los cambios en el color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) del salmón ahumado tratado con REU, APH y la combinación de ambas durante la refrigeración se muestran en la Tabla 18. Los tratamientos ( $P < 0,001$ ) y el tiempo de refrigeración ( $P < 0,001$ ) afectaron significativamente al parámetro  $L^*$  (luminosidad) en el salmón. En el día 1 los valores de  $L^*$  en el salmón control fueron similares tanto a 4 como a 10 °C. Los valores de  $L^*$  resultaron afectados ( $P < 0,05$ ) por la presión, aumentando y ocasionando un aspecto más brillante y opaco en las muestras tratadas por APH. Sin embargo, al añadir reuterina resultaron más bajos ( $P < 0,05$ ). Los valores de  $L^*$  se incrementaron durante el almacenamiento en todas las muestras, manteniéndose las diferencias entre las muestras control y las presurizadas.



**Tabla 18.** Parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) del salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

			1 d	35 d
$L^*$	4 °C	Control	45,12±1,78 <sup>Ab</sup>	52,77±1,10 <sup>Ba</sup>
		REU	41,68±1,28 <sup>Aa</sup>	50,15±1,27 <sup>Ba</sup>
		APH	58,63±2,16 <sup>Ad</sup>	62,31±4,84 <sup>Bb</sup>
		REU+APH	56,20±1,95 <sup>Ac</sup>	60,87±2,35 <sup>Bb</sup>
	10 °C	Control	45,45±1,98 <sup>Ab</sup>	52,34±2,82 <sup>Bb</sup>
		REU	41,91±2,08 <sup>Aa</sup>	50,56±1,45 <sup>Ba</sup>
		APH	58,03±0,81 <sup>Ac</sup>	58,84±1,31 <sup>Bc</sup>
		REU+APH	57,79±2,19 <sup>Ac</sup>	60,91±1,28 <sup>Bd</sup>
$a^*$	4 °C	Control	18,50±1,10 <sup>Aa</sup>	18,17±1,18 <sup>Aa</sup>
		REU	19,99±1,43 <sup>Aab</sup>	19,72±1,07 <sup>Aa</sup>
		APH	19,86±2,29 <sup>Aab</sup>	18,41±3,57 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	20,30±1,34 <sup>Ab</sup>	19,04±3,69 <sup>Aa</sup>
	10 °C	Control	18,32±1,75 <sup>Aa</sup>	18,65±1,79 <sup>Aa</sup>
		REU	19,99±1,99 <sup>Ab</sup>	20,25±1,32 <sup>Ab</sup>
		APH	21,66±1,36 <sup>Bc</sup>	19,88±2,03 <sup>Aab</sup>
		REU+APH	20,85±1,80 <sup>Abc</sup>	20,25±1,32 <sup>Ab</sup>
$b^*$	4 °C	Control	17,63±1,85 <sup>Ba</sup>	13,65±2,56 <sup>Aa</sup>
		REU	20,94±3,17 <sup>Ab</sup>	14,97±1,21 <sup>Ba</sup>
		APH	15,78±1,30 <sup>Aa</sup>	14,54±3,96 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	21,12±5,63 <sup>Bb</sup>	14,74±3,43 <sup>Aa</sup>
	10 °C	Control	18,41±4,13 <sup>Ba</sup>	12,00±2,00 <sup>Aa</sup>
		REU	19,14±4,08 <sup>Ba</sup>	15,82±2,06 <sup>Ab</sup>
		APH	17,57±2,09 <sup>Ba</sup>	13,35±1,62 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	17,30±2,54 <sup>Aa</sup>	15,99±1,30 <sup>Ab</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para cada temperatura.

Los valores de  $a^*$  (tendencia al rojo) aumentaron significativamente con los tratamientos ( $P < 0,001$ ) y el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,05$ ). A las 24 h, dichos valores fueron más altos en las muestras de salmón ahumado tratadas con REU, APH o la combinación de ambos respecto al control. A los 35 d los niveles de  $a^*$  fueron muy parecidos al control, excepto en las muestras tratadas con reuterina que presentaban valores algo mayores ( $P < 0,05$ ).

Los valores de  $b^*$  (tendencia al amarillo) resultaron influidos significativamente por los tratamientos ( $P < 0,001$ ) y el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,001$ ). Un día después de los tratamientos, los valores de  $b^*$  aumentaron en las muestras con reuterina de manera individual o combinada con las APH a 4 °C. En general, los valores disminuyeron durante el periodo de refrigeración alcanzando valores más elevados de  $b^*$  en las muestras con reuterina a 10 °C.

El color es considerado uno de los atributos más importantes en la apariencia de los alimentos. Durante el almacenamiento del pescado, los valores  $L^*$  tienden a aumentar y la apariencia se vuelve más blanquecina como consecuencia de diversos mecanismos bioquímicos (Chéret y col., 2005). Se han observado cambios en parámetros de color en salmón Marinado tratado por APH a 100 y 200 MPa, particularmente incrementos en la luminosidad (Ritz y col., 2008). Las presiones superiores a 200 MPa dieron lugar a valores de  $L^*$  más altos en salmón fresco (Amanatidou y col., 2000). En el presente trabajo también se han visto aumentos en  $L^*$  al presurizar salmón ahumado 450 MPa durante 5 min. Los cambios en el color debidos a las APH se han atribuido a la desnaturalización y reducción de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas (Angsupanich y Ledward, 1998; Marcos y col., 2010), sugiriendo una relación inversa entre variaciones en la luminosidad y la solubilidad de ambos tipo de proteínas tras un tratamiento por APH. El contenido en aminoácidos libres también resultó afectado por las APH en pescado ahumado y los cambios se asociaron a cambios en el color (Erkan y col., 2011).

No hay datos publicados acerca del efecto de la reuterina sobre el color de los alimentos. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la reuterina aumentó ligeramente la luminosidad en el salmón ahumado, y disminuyó los valores de tendencia al rojo y al amarillo. Sin embargo, y de acuerdo con el aspecto del producto, los cambios observados no inducirían al rechazo por parte de los consumidores.

#### 3.5.4.4. Formación de aminas biógenas

El contenido en las aminas biógenas resultó afectado de manera significativa ( $P < 0,001$ ) por el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,01$ ), con la excepción de la espermina y la

espermidina (Tabla 19). No se detectó triptamina en el producto. Después del tratamiento los valores de feniletilamina, putrescina, tiramina, espermina y la espermidina en el control y en el salmón ahumado tratado fueron inferiores a 6 mg/kg, mientras que la cadaverina alcanzó una concentración de 73,14 mg/kg y la histamina no fue detectada. Al final del periodo de refrigeración, la tiramina alcanzó niveles de 144 mg/kg, la histamina de hasta 65 mg/kg y la feniletilamina alcanzó niveles de aproximadamente 35 mg/kg en el salmón ahumado control. La concentración más alta fue para la cadaverina, con valores superiores a 500 mg/kg a los 35 d a las dos temperaturas de almacenamiento estudiadas. Los tratamientos de reuterina y APH, aplicados de manera individual y en combinación, evitaron la formación de aminas biógenas en salmón ahumado durante el periodo de refrigeración investigado, con contenidos menores de 5 mg/kg para todas las aminas biógenas estudiadas tras 35 d a 4 y 10 °C.

Las aminas biógenas se suelen producir por descarboxilación microbiana de los aminoácidos o por actividad descarboxilasa endógena y pueden causar efectos adversos en la salud de los consumidores. La FDA y la Comisión Europea establecieron que el límite de histamina en las especies de pescado que pertenecen a las familias que contienen cantidades altas de histidina libre, no debe de sobrepasar 50 y 100-200 ppm, respectivamente (FDA, 2011). Otras aminas biógenas no han sido reguladas por las autoridades de salud pública, aunque se ha propuesto un nivel máximo propuesto de aminas biógenas de 750-900 mg/kg (ten Brink y col., 1990; Spanjer y van Roode, 1991).

El salmón posee un alto contenido de nitrógeno no proteico, principalmente aminoácidos libres y en consecuencia la producción de aminas biógenas durante el almacenamiento es posible (Jørgensen y col., 2000). En este trabajo, los niveles de histamina en el salmón ahumado control excedieron el límite fijado por la FDA (50 ppm) después de 35 d de almacenamiento a 4 y 10 °C. El valor de aminas biógenas totales también excedió el nivel máximo propuesto (750-900 ppm). Sin embargo, los tratamientos individuales o en combinación de REU y APH evitaron su formación en este producto durante 35 d de refrigeración, incluso en condiciones de abuso de temperatura. Montiel y col. (2013) detectaron valores similares de aminas biógenas en salmón ahumado del mismo

origen, con la excepción de cadaverina cuyos valores fueron superiores en este trabajo. La acumulación de cadaverina durante el almacenamiento en refrigeración del pescado fue observada por Hoz y col. (2000) y se asoció con actividad de las *Enterobacteriaceae*. El incremento de tiramina en el salmón ahumado control puede relacionarse con la presencia de bacterias lácticas con capacidad de descarboxilar aminoácidos (Hoz y col., 2000; Montiel y col., 2013). Durante el almacenamiento en frío del salmón ahumado con alta densidad de microorganismos se detectó cadaverina, histamina, putrescina y tiramina (Cantoni y col., 1993) y la putrescina y la tiramina se formaron en salmón ahumado tratado a 200 MPa y almacenado a 14 °C (Lakshmanan y Dalgaard, 2004). También se detectaron altas concentraciones de cadaverina y tiramina a los 35 d de refrigeración en salmón ahumado control y en el producto presurizado a 250 MPa durante 10 minutos con TVC superiores a 7 log ufc/g, mientras que la formación de aminas biógenas se evitó por la combinación de 450 MPa/ 5 min y el SLP (Montiel y col., 2012).

De acuerdo con nuestros resultados las APH a 450 MPa durante 5 min y la reuterina aplicados de manera individual o en combinación permitieron evitar la producción de aminas biógenas. El bajo contenido de aminas biógenas en salmón ahumado puede atribuirse al bajo número de bacterias encontradas durante el periodo de refrigeración y/o a la posible falta de actividad descarboxilasa en la población microbiana residual.

**Tabla 19.** Contenido en aminas biógenas (mg/kg) en salmón ahumado tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		0 d	35 d	
			4 °C	10 °C
FN	Control	0,31±0,86 <sup>Aa</sup>	34,23±7,21 <sup>Bb</sup>	35,53±12,44 <sup>Bb</sup>
	REU	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	1,67±3,10 <sup>Aa</sup>
	APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
	REU+APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
PUT	Control	0,86±0,91 <sup>Aa</sup>	6,71±2,68 <sup>Bb</sup>	6,67±2,70 <sup>Ba</sup>
	REU	1,21±1,31 <sup>Aa</sup>	0,81±0,89 <sup>Aa</sup>	0,50±0,56 <sup>Aa</sup>
	APH	0,76±0,93 <sup>Aa</sup>	0,82±0,93 <sup>Aa</sup>	0,68±0,77 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	1,31±1,38 <sup>Aa</sup>	0,71±0,84 <sup>Aa</sup>	5,96±8,89 <sup>Ba</sup>
CAD	Control	73,14±18,35 <sup>Ab</sup>	537,15±51,98 <sup>Bb</sup>	512,24±60,88 <sup>Bb</sup>
	REU	0,52±1,13 <sup>Aa</sup>	0,33±0,62 <sup>Aa</sup>	2,95±2,85 <sup>Ba</sup>
	APH	1,33±1,89 <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	0,83±1,02 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	0,75±1,50 <sup>Aa</sup>	1,80±3,41 <sup>Aa</sup>	4,59±8,49 <sup>Ba</sup>
HN	Control	ND <sup>Aa</sup>	61,09±17,32 <sup>Bb</sup>	65,36±19,89 <sup>Bb</sup>
	REU	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
	APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
	REU+APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
TYN	Control	3,18±3,85 <sup>Ab</sup>	144,63±24,84 <sup>Bb</sup>	114,41±24,57 <sup>Bb</sup>
	REU	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	1,07±1,98 <sup>Ba</sup>
	APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>
	REU+APH	ND <sup>Aa</sup>	ND <sup>Aa</sup>	4,09±7,58 <sup>Ba</sup>
SDN	Control	2,87±1,02 <sup>Ba</sup>	2,88±0,80 <sup>Ba</sup>	1,61±0,86 <sup>Aa</sup>
	REU	2,88±0,97 <sup>Ba</sup>	2,09±0,65 <sup>Aa</sup>	2,82±1,82 <sup>Ba</sup>
	APH	3,18±1,39 <sup>Aa</sup>	2,64±1,16 <sup>Aa</sup>	2,23±1,07 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	2,30±0,84 <sup>Aa</sup>	2,86±1,27 <sup>Aa</sup>	4,41±4,18 <sup>Aa</sup>
SPN	Control	5,19±1,96 <sup>Ba</sup>	4,64±1,86 <sup>Ba</sup>	2,40±0,91 <sup>Aa</sup>
	REU	5,49±1,83 <sup>Ba</sup>	3,54±0,76 <sup>Aa</sup>	4,15±2,24 <sup>Ba</sup>
	APH	5,31±2,03 <sup>Aa</sup>	4,32±1,24 <sup>Aa</sup>	4,38±2,70 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	5,61±1,64 <sup>Aa</sup>	5,27±1,55 <sup>Aa</sup>	4,89±1,97 <sup>Aa</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). FN feniletilamina, PUT putrescina, CAD cadaverina, HN histamina, TYR tiramina, SDN espermidina, SPN espermina

### 3.6. INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN JAMÓN COCIDO MEDIANTE BIOCONSERVANTES Y ALTAS PRESIONES

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las altas presiones en combinación con reuterina, SLP y LF en jamón cocido loncheado almacenado en condiciones de refrigeración y de abuso de temperatura.

#### 3.6.1. Efecto frente a *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7

##### *L. monocytogenes*

El efecto sobre *L. monocytogenes* de REU, SLP y LF aplicados en jamón cocido de manera individual o combinados con altas presiones (450 MPa/ 5 min) se recoge en la Tabla 20. De acuerdo con el análisis de varianza, los recuentos del patógeno disminuyeron significativamente ( $P < 0,001$ ) por el tratamiento y aumentaron ( $P < 0,001$ ) durante el periodo de almacenamiento. Los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* en jamón cocido fueron de 5,36 log ufc/g y se incrementaron 2,25 y 2,45 u. log a lo largo de los 35 d de refrigeración a 4 y 10 °C, respectivamente. Un día después de los tratamientos en las muestras presurizadas se registraron niveles 0,8 u. log inferiores, los recuentos en las muestras a las que se añadió SLP disminuyeron 1,7 y 2,7 u. log a 4 y 10 °C respectivamente, mientras que ni la reuterina ni la LF disminuyeron los niveles del patógeno. La actividad antimicrobiana del tratamiento de APH aumentó significativamente cuando se combinó con REU o SLP. Las reducciones alcanzadas con el tratamiento de REU+APH fueron de 1,7 y 2,6 u. log a 4 y 10 °C, respectivamente. Estos valores fueron de 3,4 y 3,6 log ufc/g cuando se combinaron las APH con el SLP. Durante la refrigeración a 4 °C se observó el crecimiento del patógeno en todas las muestras con excepción del jamón tratado por APH en combinación con REU o SLP. Las APH evitaron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 21 d a 4 °C, pero finalmente hubo una recuperación del patógeno que alcanzó valores similares a los de las muestras control al final del periodo estudiado. Después de 35 d a 4 °C, los niveles de *L. monocytogenes* en jamón cocido tratado con REU+APH fueron 3,95 u. log más bajos que los valores de las muestras control. En el caso de las muestras

tratadas con SLP+APH se registraron recuentos inferiores a 2 u. log (>5 u. log más bajos que los controles). El crecimiento de *L. monocytogenes* durante el periodo de almacenamiento era dependiente de la temperatura estudiada. Bajo condiciones de abuso de temperatura (10 °C), el patógeno reinició su crecimiento en el jamón cocido presurizado a partir del día 7 alcanzando a los 21 d niveles que no diferían de manera significativa de los obtenidos en el control. El tratamiento combinado de REU+APH no consiguió evitar la recuperación de *L. monocytogenes*, pero retrasó su crecimiento durante 21 d. Finalmente, el patógeno alcanzó niveles similares a los de las muestras control después de 35 d a 10 °C. Únicamente la aplicación de SLP en combinación con las APH ralentizó la recuperación del patógeno durante el almacenamiento a 10 °C, con recuentos por debajo de 4 log ufc/g a los 35 d.

**Tabla 20.** Recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,30±0,03 <sup>Ac</sup>	6,26±0,12 <sup>Be</sup>	7,76±0,54 <sup>Cd</sup>	7,61±0,44 <sup>Cc</sup>
	REU	5,25±0,05 <sup>Ac</sup>	5,41±0,16 <sup>Ade</sup>	7,50±0,41 <sup>Bd</sup>	7,70±0,75 <sup>Bc</sup>
	SLP	3,62±0,20 <sup>Ab</sup>	3,80±1,03 <sup>Abc</sup>	4,49±0,47 <sup>Abc</sup>	6,97±0,74 <sup>Bc</sup>
	LF	5,28±0,03 <sup>Ac</sup>	6,26±0,04 <sup>Be</sup>	8,08±0,10 <sup>Cd</sup>	7,97±0,07 <sup>Cc</sup>
	APH	4,52±0,40 <sup>Ac</sup>	4,84±0,23 <sup>ABcd</sup>	5,35±0,39 <sup>Bc</sup>	7,49±0,51 <sup>Cc</sup>
	REU+APH	3,51±0,29 <sup>Ab</sup>	3,04±0,78 <sup>Ab</sup>	3,34±1,41 <sup>Ab</sup>	3,66±1,40 <sup>Ab</sup>
	SLP+APH	1,88±1,01 <sup>Aa</sup>	1,58±0,68 <sup>Aa</sup>	1,61±0,71 <sup>Aa</sup>	1,33±0,47 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	4,60±0,22 <sup>Ac</sup>	4,89±0,06 <sup>Ad</sup>	4,90±0,10 <sup>Ac</sup>	7,24±0,78 <sup>Bc</sup>
10 °C	Control	5,77±0,23 <sup>Ad</sup>	8,28±0,70 <sup>Bde</sup>	7,81±0,40 <sup>Bc</sup>	7,81±0,14 <sup>Bb</sup>
	REU	5,53±0,21 <sup>Ad</sup>	8,15±0,48 <sup>Bde</sup>	7,68±0,61 <sup>Bc</sup>	8,01±0,34 <sup>Bb</sup>
	SLP	3,05±0,19 <sup>Ab</sup>	4,67±0,15 <sup>Bb</sup>	7,47±0,12 <sup>Cc</sup>	7,72±0,72 <sup>Cb</sup>
	LF	5,89±0,12 <sup>Ad</sup>	8,67±0,41 <sup>Ce</sup>	8,14±0,24 <sup>BCc</sup>	7,59±0,47 <sup>Bb</sup>
	APH	4,57±0,34 <sup>Ac</sup>	6,22±0,41 <sup>Bc</sup>	7,59±0,70 <sup>Cc</sup>	7,73±0,16 <sup>Cb</sup>
	REU+APH	3,17±0,88 <sup>Ab</sup>	4,16±0,78 <sup>Aab</sup>	6,27±0,03 <sup>Bb</sup>	7,26±0,45 <sup>Bb</sup>
	SLP+APH	2,12±0,24 <sup>Aa</sup>	3,40±0,58 <sup>Ba</sup>	3,23±0,74 <sup>Ba</sup>	3,77±0,11 <sup>Ba</sup>
	LF+APH	4,29±0,50 <sup>Ac</sup>	7,06±0,80 <sup>Bcd</sup>	8,03±0,06 <sup>Bc</sup>	7,33±0,29 <sup>Bb</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

## S. Enteritidis

Los recuentos de *S. Enteritidis* en jamón cocido tratado con REU, SLP y LF de manera individual o combinados con las altas presiones (450 MPa/ 5 min) y almacenado

durante 35 d a 4 y 10 °C se resumen en la Tabla 21. De acuerdo con el análisis de varianza, los niveles de este patógeno disminuyeron de manera significativa ( $P < 0,001$ ) por el tratamiento, pero no fueron afectados por el tiempo ni por la temperatura de almacenamiento ( $P < 0,001$ ). Los recuentos iniciales de *S. Enteritidis* en el jamón cocido control fueron de 5,84 log ufc/g y no se incrementaron a lo largo de los 35 d de estudio. A las 24 h, en las muestras tratadas por APH los recuentos del patógeno se situaron por debajo del límite de detección (1 log ufc/g), el SLP redujo unas 2,7 u. log los niveles de *S. Enteritidis*, mientras que los otros antimicrobianos no afectaron a esta bacteria. La actividad antimicrobiana de las APH combinadas con REU, SLP o LF no aumentó respecto al tratamiento individual de las APH. Durante la refrigeración los niveles de *Salmonella* en jamón cocido tratado con reuterina disminuyeron 2 y 1 u. log a 4 y 10 °C, respectivamente. Igualmente, en las muestras tratadas con SLP disminuyeron hasta valores de alrededor de 3 u. log al final de los 35 d, y los recuentos del patógeno fueron similares a los registrados en jamón control en las muestras tratadas con LF. Los tratamientos de APH de manera individual o en combinación con los antimicrobianos mantuvieron los niveles por debajo del límite de detección durante los 35 d de estudio a 4 °C. En condiciones de abuso de temperatura (10 °C) las células dañadas subletalmente fueron capaces de crecer tanto en las muestras tratadas por APH, como en las sometidas al tratamiento combinado con LF a partir de los 21 d de estudio. En las muestras tratadas con APH+REU y APH+LPS los niveles de *S. Enteritidis* se mantuvieron por debajo de 1,5 u. log durante los 35 d de refrigeración a 10 °C.



**Tabla 21.** Recuentos de *S. Enteritidis* (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,55±0,36 <sup>Ac</sup>	5,51±0,18 <sup>Ac</sup>	5,32±0,12 <sup>Ac</sup>	5,00±0,27 <sup>Ac</sup>
	REU	5,55±0,36 <sup>Cc</sup>	4,64±0,18 <sup>Bb</sup>	4,02±0,35 <sup>ABb</sup>	3,84±0,43 <sup>Ab</sup>
	SLP	2,79±0,43 <sup>Bb</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	3,08±0,43 <sup>Bb</sup>
	LF	5,55±0,23 <sup>Ac</sup>	5,64±0,33 <sup>Ac</sup>	5,44±0,63 <sup>Ac</sup>	5,04±0,32 <sup>Ac</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	5,80±0,13 <sup>Ad</sup>	5,73±0,14 <sup>Ac</sup>	6,25±0,83 <sup>Ac</sup>	6,07±0,93 <sup>Ab</sup>
	REU	5,46±0,09 <sup>Ac</sup>	5,25±0,02 <sup>Ac</sup>	4,67±0,29 <sup>Ac</sup>	4,82±1,00 <sup>Aab</sup>
	SLP	3,02±0,03 <sup>Ab</sup>	4,00±0,34 <sup>Ab</sup>	3,90±0,60 <sup>Abc</sup>	2,30±0,85 <sup>Aab</sup>
	LF	5,76±0,22 <sup>Ac</sup>	5,67±0,29 <sup>Ac</sup>	6,02±0,19 <sup>Ac</sup>	6,10±1,18 <sup>Ab</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,70±0,99 <sup>Aab</sup>	2,69±1,40 <sup>Aab</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,35±0,49 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,70±0,99 <sup>Aab</sup>	2,27±1,79 <sup>Aab</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

### *E. coli* O157:H7

La supervivencia de *E. coli* O157:H7 en jamón cocido tratado con REU, LPS, LF de manera individual o en combinación con APH a 450 MPa/ 5 min y refrigerado durante 35 d a 4 y 10 °C se muestra en la Tabla 22. El crecimiento del patógeno se vió significativamente ( $P < 0,001$ ) reducido por los tratamientos, pero no resultó afectado por el tiempo ni por la temperatura de almacenamiento. Los recuentos iniciales fueron de 5,13 log ufc/g y no se registró crecimiento durante la conservación a 4 ó 10 °C. Un día después del tratamiento por APH los recuentos del patógeno se situaron por debajo del límite de detección (1 log ufc/g). Los tratamientos combinados no incrementaron significativamente la actividad individual de la presurización. La REU y el SLP disminuyeron ( $P < 0,05$ ) los niveles del patógeno a 4 °C, mientras que la LF no afectó a su supervivencia en jamón cocido. Durante la refrigeración, los recuentos de *E. coli* O157:H7 a 4 °C en las muestras tratadas con REU disminuyeron, con valores 1,7 u. log inferiores que en las muestras control a los 35 d. Con LPS se registraron recuentos 1,5 u. log inferiores al final del periodo

de estudio. Todos los tratamientos combinados mantuvieron los recuentos por debajo del límite de detección durante 35 d a 4 °C. En condiciones de abuso de temperatura hubo una recuperación celular en las muestras de jamón cocido tratadas por APH y con su combinación con LF a partir del día 7, pero no superaron 2,5 log ufc/g después de los 35 d de almacenamiento. Únicamente los tratamientos combinados con REU y SLP evitaron la recuperación del patógeno a 10 °C durante los 35 d de refrigeración.

**Tabla 22.** Recuentos de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) en jamón tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d	7 d	21 d	35 d
4 °C	Control	5,01±0,19 <sup>Ab</sup>	5,25±0,12 <sup>Ac</sup>	5,17±0,39 <sup>Ac</sup>	4,98 ± 0,04 <sup>cA</sup>
	REU	4,39±0,11 <sup>Cb</sup>	3,78±0,05 <sup>Bb</sup>	3,42±0,31 <sup>ABb</sup>	3,28 ± 0,06 <sup>bA</sup>
	SLP	1,27±0,38 <sup>Aa</sup>	1,24±0,34 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,39 ± 0,55 <sup>aA</sup>
	LF	4,74±0,28 <sup>ABb</sup>	5,53±0,19 <sup>Cc</sup>	5,32±0,04 <sup>BCc</sup>	4,62 ± 0,00 <sup>cA</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>aA</sup>	<1,00 <sup>aA</sup>	<1,00 <sup>aA</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	6,25±0,16 <sup>Bc</sup>	5,84±0,47 <sup>ABb</sup>	5,70±0,17 <sup>ABc</sup>	5,05±0,07 <sup>Ac</sup>
	REU	4,69±0,62 <sup>Ab</sup>	4,88±0,51 <sup>Ab</sup>	5,32±0,47 <sup>Ac</sup>	4,68±0,27 <sup>Ac</sup>
	SLP	1,45±0,21 <sup>Aa</sup>	1,70±0,61 <sup>Aa</sup>	1,15±0,21 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF	5,86±0,40 <sup>Ac</sup>	6,19±0,06 <sup>Ab</sup>	6,01±0,52 <sup>Ac</sup>	5,44±0,59 <sup>Ac</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,45±0,64 <sup>Aa</sup>	1,50±0,71 <sup>Aa</sup>	2,42±0,38 <sup>Ab</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,30±0,00 <sup>Aa</sup>	3,45±0,80 <sup>Bb</sup>	2,35±0,50 <sup>ABb</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los productos RTE se consumen sin un procesamiento efectivo que les permita eliminar o reducir a niveles aceptables los microorganismos alterantes o los patógenos causantes de zoonosis (EC, 2005). *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 son los patógenos de mayor interés ya que pueden crecer en estos productos, por lo que es fundamental investigar estrategias para combatir su presencia. De acuerdo con nuestros resultados, *S. Enteritidis* y *E. coli* no fueron capaces de crecer en el jamón presurizado durante 35 d a 4 °C, mientras que el daño causado en las células de *L. monocytogenes* no fue suficiente para evitar una recuperación en su crecimiento tanto a 4 como a 10 °C,

alcanzándose niveles similares a los de las muestras control. La recuperación de *L. monocytogenes* tras un tratamiento de altas presiones también fue descrita en jamón cocido presurizado (Aymerich y col. 2005), y en salmón ahumado presurizado (Medina y col., 2009; Montiel y col., 2012). La combinación de APH y bioconservantes dio lugar a un efecto antimicrobiano sinérgico frente a *L. monocytogenes* en salmón ahumado tratado con REU+APH durante 35 d de almacenamiento a 4°C (apartado 3.5.1.). Como se ha mencionado anteriormente, existen estudios en los que se han utilizado las APH junto con bacteriocinas (Garriga y col., 2000; De Alba y col., 2013), mientras que apenas se ha investigado la combinación de APH con reuterina, SLP o LF.

La reuterina a una concentración de 8 UA/ml añadida al jamón cocido resultó bacteriostática frente a *L. monocytogenes* durante 7 d a 4 °C y 1 d a 10 °C. En leche, la reuterina actuó como bacteriostático a 37 °C (Arqués y col., 2004) y bactericida a 4 °C (Arqués y col., 2011). Por otra parte, se ha comprobado que el efecto inhibitorio de la reuterina aumenta con la concentración de sal aumentando así el periodo de latencia en *L. innocua* (Rasch y col., 2007). Por tanto, la variabilidad de los resultados en la actividad antimicrobiana de la reuterina podría explicarse por las distintas concentraciones de sal presentes en los sistemas alimentarios, entre otros factores. La reuterina fue bactericida frente a *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 en leche durante 12 d a 4 °C (Arqués y col., 2008). En el presente trabajo, se obtuvieron resultados similares, disminuyendo 2,0 y 1,85 u. log, respectivamente, en comparación con el jamón control a los 35 d a 4 °C. *E. coli* O157:H7 se mostró más resistente a la presión que distintas cepas de *S. Enteritidis* en jamón cocido (Garriga y col., 2002). El serotipo O157:H7 de *E. coli* ha sido caracterizado como resistente a la presión (Benito y col., 1999). El efecto antimicrobiano de la reuterina junto con las APH observado en jamón cocido coincide con el resultado en salmón ahumado (apartados 3.5.1. y 3.5.2.). De acuerdo con ambos trabajos, el tratamiento de 450 MPa/ 5 min en combinación con la reuterina mostró un efecto sinérgico antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* que no fue capaz de recuperarse durante 35 d a 4°C, manteniendo los niveles de *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 por debajo del límite de detección (1 u. log) a

los 35 d a 4 y 10 °C. De este modo se comprobó, al igual que en salmón ahumado, que la reuterina reforzó el daño causado por las APH.

El poder antimicrobiano de SLP en alimentos depende de la carga inicial, el medio de cultivo y la temperatura (Seifu y col., 2005). En leche, se registró un efecto bactericida frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 (Arqués y col., 2008; Arqués y col., 2011). El SLP añadido a carne fresca a 1,9 U/cm<sup>2</sup> mostró un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* durante 7 d a 12 °C, con valores 2,6 u. log más bajos que el control al final del periodo de refrigeración (Elliot y col., 2004). En nuestro trabajo la adición de SLP (2,8 U/g) dio lugar a una reducción significativa en los niveles iniciales de *S. Enteritidis* y *E. coli* manteniendo los recuentos en 3 u. log o inferiores, después de 35 d de almacenamiento a 4 y 10 °C. Por el contrario, en la superficie de carpaccio de ternera no se encontró actividad antimicrobiana de SLP frente a *L. monocytogenes*, *S. Enterica* y *E. coli* O157:H7 (Bravo y col., 2014). Los autores de este trabajo atribuyeron esta ausencia de eficacia antimicrobiana a un posible reparto irregular en el producto y una interferencia con los componentes de la carne o los agentes de curado que se adicionan al carpaccio. Las reducciones de *S. Enteritidis* conseguidas en jamón curado presurizado (450 MPa/ 10 min) y tratado con SLP fueron de 4,32 u. log (De Alba y col., 2015). En nuestro trabajo, la adición de 2,8 U/ g de SLP en la superficie del jamón cocido retrasó el crecimiento de *L. monocytogenes* extendiendo su fase de latencia al menos 7 d a 4 °C. Asimismo, la adición de SLP disminuyó significativamente los niveles de *S. Enteritidis* y *E. coli* manteniendo los recuentos inferiores a 3 u. log tras 35 d de estudio a 4 y 10 °C. La eficacia de la combinación de APH y SLP frente a patógenos gram negativos y gram positivos se demostró en leche (García-Graells y col., 2003) siendo más efectivo que la combinación de las APH con nisina, lisozima y otras bacteriocinas. El efecto antimicrobiano sinérgico de las APH y SLP frente a *L. monocytogenes* se había detectado en salmón ahumado por Montiel y col. (2012). El daño causado en la pared celular por las APH podría facilitar la entrada de OSCN<sup>-</sup> y HOSCN en el interior de la célula, potenciando la actividad antimicrobiana de esos compuestos, disminuyendo la capacidad de autorreparación, inactivando así al patógeno.

Nuestros resultados confirmaron el efecto antimicrobiano sinérgico de las APH y junto con el SLP en jamón cocido refrigerado durante 35 d a 4 y 10 °C.

Como se ha indicado anteriormente, la actividad antimicrobiana parece ser limitada en medios complejos y sistemas alimentarios (Murdock y col., 2007; Del Olmo y col., 2012a). La LF añadida a un tampón Tris HCl 5 mg/ml consiguió reducciones de hasta 7 u. log en los recuentos de *L. monocytogenes*. Sin embargo, en combinación con las APH (400 MPa/ 10 min) únicamente aumentó ligeramente el efecto del antimicrobiano aplicado de manera individual en filetes de pollo inoculados con *L. monocytogenes* (Del Olmo y col., 2012a). Las APH (450 MPa/ 10 min) en pollo disminuyeron los niveles de *E. coli* 5 u. log, mientras al combinar este tratamiento con LF se registró una reducción adicional de sólo 0,5 u. log (Del Olmo y col., 2012b). Según un trabajo de Masschalck y col. (2001) este efecto bactericida de la LF combinada con las APH aumenta en condiciones *in vitro*. En nuestro trabajo, al aplicar LF junto con las APH no se observó un efecto antimicrobiano adicional.

### 3.6.2. Efecto sobre los microorganismos totales

Los recuentos de los microorganismos totales (TVC) en jamón cocido tratado con REU, LPS y LF de manera individual o con APH a 450 MPa/ 5 min y refrigerado durante 35 d a 4 y 10 °C se muestran en la Tabla 23.

El crecimiento de TVC se vió significativamente ( $P < 0,001$ ) reducido por los tratamientos, incrementado ( $P < 0,001$ ) por el tiempo de almacenamiento mientras no se vió afectado por la temperatura de almacenamiento. Los recuentos iniciales de 1,9 u. log aumentaron lentamente durante el almacenamiento hasta alcanzar 3,8 u. log a los 35 d a 4 °C, permaneciendo por debajo del nivel considerado como umbral de deterioro (6 log ufc/g) por Stekelenburg y Kant-Muermans (2001).

**Tabla 23.** Recuentos de microorganismos totales (log ufc/g) en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		0 d	15 d	35 d
4 °C	Control	1,94±0,66 <sup>Ac</sup>	1,45±0,58 <sup>Aa</sup>	3,81±1,92 <sup>Ab</sup>
	REU	1,85±0,19 <sup>Abc</sup>	1,25±0,50 <sup>Aa</sup>	1,25±0,50 <sup>Aa</sup>
	SLP	1,33±0,47 <sup>Aabc</sup>	1,08±0,15 <sup>Aa</sup>	1,65±0,75 <sup>Aa</sup>
	LF	1,27±0,37 <sup>Aabc</sup>	1,62±0,74 <sup>Aa</sup>	4,54±0,06 <sup>Bc</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,15±0,17 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	1,23±0,29 <sup>Aabc</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	1,08±0,15 <sup>Aab</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	1,90±0,62 <sup>Ab</sup>	1,42±0,49 <sup>Aa</sup>	6,55±1,54 <sup>Bb</sup>
	REU	1,27±0,37 <sup>Aab</sup>	1,25±0,50 <sup>Aa</sup>	1,79±0,93 <sup>Aa</sup>
	SLP	1,08±0,15 <sup>Aab</sup>	1,25±0,50 <sup>Aa</sup>	1,58±0,68 <sup>Aa</sup>
	LF	1,65±0,60 <sup>Aab</sup>	1,25±0,50 <sup>Aa</sup>	7,11±0,58 <sup>Bb</sup>
	APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,08±0,15 <sup>Aa</sup>	2,56±0,32 <sup>Ba</sup>
	REU+APH	1,25±0,50 <sup>Aab</sup>	1,15±0,17 <sup>Aa</sup>	1,43±0,34 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,07±0,15 <sup>Aa</sup>	1,07±0,15 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	<1,00 <sup>Aa</sup>	<1,00 <sup>Aa</sup>	1,42±0,49 <sup>Aa</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

En condiciones de abuso de temperatura (10 °C) los recuentos alcanzaron 6,5 u. log a los 35 d. En las muestras tratadas con REU o LPS los recuentos se mantuvieron por debajo de 2 u. log a 4 y 10 °C. Sin embargo, con LF los TVC aumentaron hasta alcanzar 4,5 y 7,11 u. log a 4 y 10 °C, respectivamente. La presurización a 450 MPa/ 5 min redujo los niveles de este grupo por debajo del límite de detección (1 log cfu/g) a 4 °C durante todo el estudio. En jamón cocido tratado con APH junto con REU, SLP y LF los niveles también se mantuvieron por debajo del límite de detección. A 10 °C, con las APH se observó una recuperación, alcanzándose niveles de 2,5 u. log a día 35, mientras que en el jamón cocido al que se aplicaron tratamientos combinados, los recuentos se mantuvieron por debajo de 1,5 u. log durante los 35 d de almacenamiento.

La vida útil de los productos cárnicos loncheados no suele superar los 30 d a temperaturas de refrigeración. Los microorganismos más frecuentes en la microbiota del jamón cocido son BAL, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp. y levaduras (Heiszler y col., 1972; Borch y col., 1996; Holm y col., 2012). La alteración del jamón

cocido loncheado suele ir acompañada de sabor agrio, un exudado baboso e hinchazón del envase debido a la producción de gas, producido generalmente por las BAL (Samelis y col., 1998) cultivos de BAL y sus metabolitos (Jofré y col., 2008; Liu y col., 2012). Entre las estrategias para alargar la vida útil de productos cárnicos RTE se han propuesto cultivos de BAL y sus metabolitos (Jofré y col., 2008; Liu y col., 2012). Asimismo, la reuterina, el SLP y la LF y se han investigado principalmente frente a distintos patógenos en productos lácteos (Arqués y col., 2008; Arqués y col., 2011) y carnes (El-Ziney y col., 1999; Kuleaşan y Cakmakçi, 2002, Del Olmo y col., 2012a, b), pero apenas en el control de microorganismos alterantes. La reuterina en salmón ahumado disminuyó los niveles de TVC por debajo del límite de deterioro durante 35 y 21 d a 4 y 10 °C, respectivamente (apartado 3.6.2.). Frente a los TVC en jamón cocido la reuterina ejerció una potente acción bacteriostática, manteniendo los niveles por debajo de 2 u. log durante 35 d a 4 y 10 °C.

El SLP retardó el crecimiento de TVC en ternera a temperaturas de refrigeración (Elliot y col., 2004). El efecto en carne picada fue estudiado por Kennedy y col. (2000), que detectaron una actividad bacteriostática sobre la mayoría de las poblaciones bacterianas estudiadas. De acuerdo con nuestros resultados, con el SLP al jamón cocido no hubo crecimiento de TVC durante 35 d a 4 y 10 °C, y los niveles se mantuvieron por debajo de los valores de las muestras control a día 0.

La LF se incorporada en la formulación de salchichas no afectó a las poblaciones microbianas (Al-Nablusi y Holley, 2007). Según nuestros resultados, tampoco en jamón cocido se registró reducción del crecimiento microbiano, con niveles de TVC similares en las muestras tratadas y las control durante 35 d a 4 y 10 °C.

Las APH redujeron los niveles de TVC por debajo de los límites de detección (1 log ufc/g) durante 35 d a 4 °C, extendiendo así su vida útil. Sin embargo, cuando el jamón cocido se almacenó a 10 °C, hubo una recuperación en el crecimiento al final del almacenamiento. De acuerdo con nuestros resultados, los tratamientos combinados aumentaron la actividad bactericida de las APH frente a los microorganismos alterantes, retardando la recuperación de los TVC en jamón cocido a 10 °C.

### 3.6.3. Efecto sobre las características del jamón cocido

#### 3.6.3.1. pH y $a_w$

Los valores de pH de las muestras tratadas por APH y su combinación con REU, SLP y LF se recogen en la Tabla 24. Según el análisis de la varianza ni los tratamientos, ni el tiempo ni la temperatura de almacenamiento influyeron de manera significativa sobre la evolución del pH en las muestras de jamón cocido. Los valores de pH se situaron entre 6,80 y 6,97 a 4 °C y entre 6,63 y 7,10 a 10 °C, mostrando una estabilidad durante la refrigeración asociada probablemente a la ausencia de actividad microbiana. Únicamente hubo un incremento de pH que se registró en jamón cocido control tras 35 d a 10 °C, que se correspondería con el mayor recuento de TVC (6,55 log ufc/g).

**Tabla 24.** Valores de pH en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		0 d	15 d	35 d
4 °C	Control	6,82±0,05 <sup>Aa</sup>	6,86±0,05 <sup>Aa</sup>	6,86±0,08 <sup>Aa</sup>
	REU	6,81±0,10 <sup>Aa</sup>	6,80±0,04 <sup>Aa</sup>	6,84±0,19 <sup>Aa</sup>
	SLP	6,83±0,17 <sup>Aa</sup>	6,83±0,02 <sup>Aa</sup>	6,95±0,11 <sup>Aa</sup>
	LF	6,84±0,12 <sup>Aa</sup>	6,84±0,10 <sup>Aa</sup>	6,92±0,16 <sup>Aa</sup>
	APH	6,89±0,17 <sup>Aa</sup>	6,94±0,09 <sup>Aa</sup>	6,87±0,09 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	6,85±0,07 <sup>Aa</sup>	6,83±0,02 <sup>Aa</sup>	6,94±0,14 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	6,85±0,08 <sup>Aa</sup>	6,83±0,06 <sup>Aa</sup>	6,96±0,05 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	6,86±0,15 <sup>Aa</sup>	6,87±0,05 <sup>Aa</sup>	6,86±0,06 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	6,86±0,19 <sup>Aa</sup>	6,88±0,06 <sup>Ab</sup>	7,10±0,10 <sup>Ab</sup>
	REU	6,75±0,18 <sup>Aa</sup>	6,88±0,05 <sup>Ab</sup>	6,81±0,19 <sup>Aab</sup>
	SLP	6,85±0,10 <sup>Aa</sup>	6,76±0,02 <sup>Aa</sup>	6,90±0,07 <sup>Aab</sup>
	LF	6,86±0,09 <sup>Aa</sup>	6,83±0,01 <sup>Aab</sup>	6,63±0,39 <sup>Aa</sup>
	APH	6,92±0,14 <sup>Aa</sup>	6,85±0,07 <sup>Aab</sup>	6,95±0,05 <sup>Aab</sup>
	REU+APH	6,88±0,17 <sup>Aa</sup>	6,83±0,04 <sup>Aab</sup>	6,97±0,78 <sup>Aab</sup>
	SLP+APH	6,87±0,23 <sup>Aa</sup>	6,85±0,04 <sup>Aab</sup>	6,94±0,68 <sup>Aab</sup>
	LF+APH	6,94±0,07 <sup>Aa</sup>	6,87±0,03 <sup>Ab</sup>	6,80±0,23 <sup>Aab</sup>

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de las muestras estudiadas por duplicado en duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de  $a_w$  obtenidos en jamón cocido tratado por APH y su combinación con REU, SLP y LF se recogen en la Tabla 25. El tiempo y la temperatura de almacenamiento influyeron de manera significativa ( $P < 0,05$ ) en los valores de  $a_w$ ,



mientras que no lo hizo el tratamiento aplicado. A día 0, los valores de  $a_w$  en las muestras control fueron de 0,967 y 0,979 a 4 y 10 °C, respectivamente. Se registró un descenso en el control y en las muestras tratadas durante el periodo de refrigeración a 4 y 10 °C con valores entre 0,967 y 0,971 después de 35 d.

**Tabla 25.** Valores de  $a_w$  en jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		0 d	15 d	35 d
4 °C	Control	0,967±0,005 <sup>Aa</sup>	0,973±0,004 <sup>Aa</sup>	0,968±0,003 <sup>Aa</sup>
	REU	0,971±0,006 <sup>Aab</sup>	0,967±0,004 <sup>Aa</sup>	0,971±0,002 <sup>Aa</sup>
	SLP	0,973±0,002 <sup>Bab</sup>	0,973±0,001 <sup>Ba</sup>	0,967±0,001 <sup>Aa</sup>
	LF	0,976±0,003 <sup>Bb</sup>	0,971±0,001 <sup>Aba</sup>	0,970±0,002 <sup>Aa</sup>
	APH	0,973±0,002 <sup>Aab</sup>	0,973±0,003 <sup>Aa</sup>	0,970±0,001 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	0,977±0,002 <sup>Bb</sup>	0,972±0,003 <sup>Aa</sup>	0,970±0,003 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	0,978±0,003 <sup>Bb</sup>	0,972±0,002 <sup>Aa</sup>	0,969±0,001 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	0,980±0,002 <sup>Bb</sup>	0,971±0,001 <sup>Aa</sup>	0,970±0,002 <sup>Aa</sup>
10 °C	Control	0,978±0,001 <sup>Ba</sup>	0,972±0,001 <sup>Aa</sup>	0,970±0,003 <sup>Aa</sup>
	REU	0,981±0,001 <sup>Bab</sup>	0,971±0,001 <sup>Aa</sup>	0,970±0,003 <sup>Aa</sup>
	SLP	0,981±0,001 <sup>Bab</sup>	0,970±0,003 <sup>Aa</sup>	0,968±0,002 <sup>Aa</sup>
	LF	0,980±0,003 <sup>Bab</sup>	0,970±0,002 <sup>Aa</sup>	0,968±0,002 <sup>Aa</sup>
	APH	0,980±0,003 <sup>Bab</sup>	0,971±0,002 <sup>Aa</sup>	0,969±0,000 <sup>Aa</sup>
	REU+APH	0,983±0,001 <sup>Cb</sup>	0,972±0,002 <sup>Ba</sup>	0,968±0,001 <sup>Aa</sup>
	SLP+APH	0,983±0,001 <sup>Cb</sup>	0,970±0,003 <sup>Ba</sup>	0,967±0,001 <sup>Aa</sup>
	LF+APH	0,980±0,001 <sup>Bab</sup>	0,972±0,002 <sup>Aa</sup>	0,970±0,001 <sup>Aa</sup>

Los valores expresan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

### 3.6.3.2. Textura

Los cambios en la fuerza al corte en jamón cocido tratados con APH, con los distintos antimicrobianos aplicados individualmente o en combinación con las APH se exponen en la Tabla 26. La temperatura y el tiempo de almacenamiento afectaron de manera significativa ( $P < 0,001$ ) a la textura del jamón cocido, así como el tratamiento ( $P < 0,05$ ) al que se sometieron las muestras. Inmediatamente después del tratamiento, se observaron pequeñas diferencias en la fuerza al corte entre el control y el jamón cocido tratado oscilando entre 5,73 y 8,70 a ambas temperaturas. Durante la refrigeración la

dureza del producto mostró una tendencia a aumentar en las muestras tratadas con reuterina, SLP y LF, individualmente o en combinación con APH a 4 y 10 °C.

**Tabla 26.** Determinación de la fuerza al corte de la muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

		1 d		35 d
Fuerza al corte (N)	4 °C	Control	7,46±0,97 <sup>Ac</sup>	6,97±1,03 <sup>Aa</sup>
		REU	6,87±0,68 <sup>Abc</sup>	7,61±0,67 <sup>Bab</sup>
		SLP	5,73±0,50 <sup>Aa</sup>	7,69±1,32 <sup>Bab</sup>
		LF	6,65±1,07 <sup>Aabc</sup>	8,45±1,60 <sup>Bab</sup>
		APH	6,26±0,46 <sup>Aab</sup>	8,64±1,87 <sup>Bab</sup>
		REU+APH	6,93±0,32 <sup>Abc</sup>	9,33±3,14 <sup>Bb</sup>
		SLP+APH	7,49±0,86 <sup>Ac</sup>	7,67±0,61 <sup>Aab</sup>
		LF+APH	8,66±1,23 <sup>Ad</sup>	8,27±1,30 <sup>Aab</sup>
	10 °C	Control	7,88±0,056 <sup>Aa</sup>	9,76±1,34 <sup>Ba</sup>
		REU	7,79±1,34 <sup>Aa</sup>	11,70±0,66 <sup>Bc</sup>
		SLP	7,64±1,81 <sup>Aa</sup>	11,65±1,98 <sup>Bbc</sup>
		LF	7,55±1,35 <sup>Aa</sup>	11,13±1,66 <sup>Babc</sup>
		APH	8,57±0,59 <sup>Aa</sup>	11,51±1,75 <sup>Bbc</sup>
		REU+APH	8,22±0,90 <sup>Aa</sup>	11,01±1,01 <sup>Babc</sup>
		SLP+APH	7,75±1,08 <sup>Aa</sup>	10,20±0,99 <sup>Babc</sup>
		LF+APH	8,70±2,49 <sup>Aa</sup>	9,95±1,28 <sup>Aab</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

La textura es una característica importante de la calidad del jamón cocido, que puede verse afectada por la aplicación de bioconservantes y tratamientos de presurización. El efecto de la reuterina, el SLP o la LF sobre el jamón cocido no ha sido investigado previamente. En este trabajo, la fuerza al corte no sufrió cambios significativos en el jamón cocido con reuterina tras el tratamiento, tendiendo a aumentar durante la refrigeración a 4 y 10 °C. Se observó una tendencia similar en salmón ahumado (apartado 3.5.4.2).

Con el SLP se observó un aumento en la fuerza al corte durante el almacenamiento, efecto también registrado en salmón ahumado (Montiel y col., 2012) y jamón curado (De Alba y col. 2015).

El efecto de las APH en la textura de la carne depende del rigor mortis, de la temperatura, la duración del tratamiento y la intensidad de la presión (Galazka y Ledward, 1998; Ma y Ledward, 2004; Sun y Holley, 2010) y puede tanto aumentar la ternura como

disminuirla. Las APH a 450 MPa/ 10 min no tuvieron efecto en las características sensoriales del jamón Serrano curado a los 7 d de la presurización (Morales y col., 2006), mientras que en carpaccio de cerdo curado los valores de fuerza al corte tendieron a aumentar cuando se aplicaron APH entre 400 y 600 MPa (Realini y col., 2011). En el presente trabajo, la fuerza al corte no se incrementó inmediatamente después de los tratamientos, pero tuvo una tendencia a aumentar durante el almacenamiento cuando se aplicaron APH y su combinación con reuterina y SLP.

### 3.6.3.3. Color

Los cambios en el color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) del jamón cocido tratado por APH y la combinación con REU, SLP y LF se muestran en la Tabla 27.

**Tabla 27.** Valor  $L^*$  en las muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/ml), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

			0 d	35 d
$L^*$	4 °C	Control	59,98±0,80 <sup>Aa</sup>	60,20±3,84 <sup>Aa</sup>
		REU	60,91±1,88 <sup>Aa</sup>	61,58±1,88 <sup>Aa</sup>
		SLP	60,62±1,78 <sup>Aa</sup>	60,88±1,30 <sup>Aa</sup>
		LF	60,19±1,17 <sup>Aa</sup>	60,60±1,25 <sup>Aa</sup>
		APH	60,78±1,68 <sup>Aa</sup>	60,93±2,30 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	59,94±1,07 <sup>Aa</sup>	61,07±1,02 <sup>Ba</sup>
		SLP+APH	61,05±1,78 <sup>Aa</sup>	61,16±1,01 <sup>Aa</sup>
		LF+APH	61,25±2,36 <sup>Aa</sup>	60,19±1,59 <sup>Aa</sup>
	10 °C	Control	59,91±1,21 <sup>Aa</sup>	60,35±1,26 <sup>Aa</sup>
		REU	60,47±1,22 <sup>Aa</sup>	60,43±1,17 <sup>Aa</sup>
		SLP	61,48±1,17 <sup>Aa</sup>	61,72±1,09 <sup>Aa</sup>
		LF	61,47±1,19 <sup>Aa</sup>	60,96±0,85 <sup>Aa</sup>
		APH	60,54±1,13 <sup>Aa</sup>	60,79±0,79 <sup>Aa</sup>
		REU+APH	60,46±0,80 <sup>Aa</sup>	60,35±0,96 <sup>Aa</sup>
		SLP+APH	61,47±1,17 <sup>Aa</sup>	61,93±0,73 <sup>Aa</sup>
		LF+APH	60,75±1,57 <sup>Aa</sup>	61,41±1,08 <sup>Aa</sup>

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de las muestras estudiadas por duplicado en dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de  $L^*$  sufrieron muy pocos cambios a lo largo del periodo de estudio, oscilando sus valores entre 59,91 y 61,93. El tratamiento aplicado influyó de manera significativa ( $P < 0,001$ ) en los valores de  $L^*$  mientras que no se registraron cambios debidos

al tiempo ni la temperatura de almacenamiento. Los valores oscilaron entre 60,35 y 61,93. Los valores de  $a^*$  disminuyeron significativamente ( $P < 0,001$ ) debido a los tratamientos, especialmente las muestras de jamón cocido a las que se añadió SLP, individualmente o combinado con las APH. Este parámetro de color no fue influido por el tiempo de almacenamiento, sin registrarse cambios a los 35 d de estudio a 4 y 10 °C. Los valores de  $b^*$  tendieron a aumentar ( $P < 0,01$ ) en las muestras tratadas con SLP, de manera individual o combinada con las APH, mientras disminuyeron durante el proceso de refrigeración, aunque las diferencias entre el control y las muestras tratadas con SLP se atenuaron tras 35 d.

**Tabla 28.** Valor  $a^*$  en las muestras de jamón tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

			0 d	35 d
$a^*$	4 °C	Control	10,21±0,65 <sup>Ab</sup>	9,93±1,04 <sup>Abc</sup>
		REU	10,06±0,78 <sup>Ab</sup>	10,08±0,59 <sup>Abc</sup>
		SLP	9,31±0,53 <sup>Ba</sup>	8,72±0,88 <sup>Aa</sup>
		LF	10,68±0,51 <sup>Ab</sup>	10,52±0,51 <sup>Ac</sup>
		APH	10,39±0,55 <sup>Ab</sup>	10,38±0,98 <sup>Ac</sup>
		REU+APH	10,48±0,42 <sup>Ab</sup>	10,31±0,66 <sup>Ac</sup>
		SLP+APH	9,10±0,53 <sup>Aa</sup>	9,39±0,58 <sup>Aab</sup>
		LF+APH	10,11±0,83 <sup>Ab</sup>	10,57±1,04 <sup>Ac</sup>
	10 °C	Control	10,32±0,42 <sup>Ab</sup>	10,15±0,65 <sup>Ab</sup>
		REU	10,10±0,63 <sup>Ab</sup>	10,44±0,52 <sup>Ab</sup>
		SLP	8,97±0,58 <sup>Aa</sup>	9,08±0,69 <sup>Aa</sup>
		LF	10,00±0,64 <sup>Ab</sup>	10,22±0,32 <sup>Ab</sup>
		APH	10,50±0,52 <sup>Ab</sup>	10,26±0,39 <sup>Ab</sup>
		REU+APH	10,25±0,47 <sup>Ab</sup>	10,50±0,44 <sup>Ab</sup>
		SLP+APH	9,30±0,53 <sup>Aa</sup>	9,07±0,64 <sup>Aa</sup>
		LF+APH	10,12±0,63 <sup>Ab</sup>	10,32±0,47 <sup>Ab</sup>

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de las muestras estudiadas por duplicado en dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

El color es uno de los parámetros más relevantes en la apariencia de los alimentos. La aplicación de bioconservantes o tratamientos de APH para controlar a los microorganismos patógenos y alterantes puede ocasionar cambios en el color que influyan en la aceptabilidad del consumidor.

**Tabla 29.** Valor  $b^*$  en las muestras de jamón cocido tratado con reuterina (REU, 8 UA/g), el sistema lactoperoxidasa (SLP, 2,8 U/g), lactoferrina (LF, 0,1%), altas presiones (APH, 450 MPa/ 5 min) y sus combinaciones, almacenado a 4 y 10 °C durante 35 d

			0 d	35 d
$b^*$	4 °C	Control	8,50±1,60 <sup>Aa</sup>	8,13±1,44 <sup>Aa</sup>
		REU	9,20±1,78 <sup>Aab</sup>	9,00±0,57 <sup>Aab</sup>
		SLP	10,06±1,73 <sup>Bab</sup>	8,75±0,75 <sup>Aab</sup>
		LF	9,22±1,76 <sup>Aab</sup>	8,80±0,61 <sup>Aab</sup>
		APH	8,77±2,00 <sup>Aab</sup>	8,47±0,56 <sup>Aab</sup>
		REU+APH	9,31±1,60 <sup>Aab</sup>	9,09±0,54 <sup>Ab</sup>
		SLP+APH	10,48±1,63 <sup>Bb</sup>	8,96±1,28 <sup>Aab</sup>
		LF+APH	8,72±1,91 <sup>Aab</sup>	8,76±0,60 <sup>Aab</sup>
	10 °C	Control	9,12±1,42 <sup>Aa</sup>	8,47±0,36 <sup>Aa</sup>
		REU	8,76±1,55 <sup>Aa</sup>	9,83±1,35 <sup>Bbc</sup>
		SLP	10,44±2,09 <sup>Aa</sup>	9,39±1,13 <sup>Aabc</sup>
		LF	8,87±1,38 <sup>Aa</sup>	8,91±0,59 <sup>Aab</sup>
		APH	8,86±1,97 <sup>Aa</sup>	8,90±0,83 <sup>Aab</sup>
		REU+APH	9,26±1,75 <sup>Aa</sup>	10,22±0,90 <sup>Ac</sup>
		SLP+APH	10,47±1,99 <sup>Aa</sup>	9,68±0,64 <sup>Abc</sup>
		LF+APH	9,30±2,15 <sup>Aa</sup>	8,87±0,90 <sup>Aab</sup>

Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de las muestras estudiadas por duplicado en dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para la temperatura descrita.

Las APH en general aumentan la luminosidad y disminuyen la tendencia al rojo en productos cárnicos curados (De Alba y col., 2012b; Simonin y col., 2012; De Alba y col., 2013). Estos cambios suelen estar relacionados tanto con las alteraciones en la mioglobina, como oxidación y/o desplazamiento o liberación del grupo hemo (Carlez y col., 1995). En productos cárnicos cocidos, la mioglobina se desnaturaliza durante el tratamiento y como consecuencia no se suelen detectar diferencias en el color entre productos tratados o no por APH (Arneth, 1998; Vercammen y col., 2011). Por otra parte, existen pocos estudios sobre el efecto de la reuterina, SLP o LF en el color. En salmón ahumado se observaron valores de  $L^*$  más bajos, así como un incremento de  $a^*$  y  $b^*$  al tratar las muestras con reuterina. Por el contrario, en jamón cocido, no se detectaron cambios significativos en los parámetros de color estudiados cuando se añadió reuterina. Esta diferencia podría atribuirse al contenido en aminoácidos libres del salmón ahumado, que se ha asociado con cambios en el color (Erkan y col., 2011), y podrían resultar afectados por la reuterina debido a su alta reactividad con los grupos sulfhidrilo. La influencia del SLP sobre el color en salmón ahumado resultó en un aumento en los valores  $L^*$  y una disminución en los

valores  $a^*$  (Montiel y col., 2012). Esta tendencia se ha observado también en jamón cocido en el presente trabajo, aunque la mayor diferencia entre muestras control y tratadas fue inferior a dos unidades, que no afectó al aspecto visual y por tanto no influiría en la aceptabilidad del consumidor. La combinación de APH y SLP también registró cambios en el color, mientras que la combinación de reuterina o LF junto con las APH mantuvo los valores sin cambios a lo largo de todo el estudio a 4 y 10 °C. Estos resultados fueron similares a los observados por Liu y col. (2011) en jamón cocido presurizado en combinación con bioconservantes como bacteriocinas o lactatos.

### 3.7. DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR DE *LB. REUTERI* INIA P572 EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS

#### 3.7.1. Optimización de la producción de reuterina en queso

Con el fin de optimizar la producción de reuterina en queso se ensayaron distintas concentraciones de glicerol añadiendo *Lb. reuteri* como adjunto al cultivo iniciador comercial a niveles de  $10^6$  log ufc/ml leche.

Se obtuvieron quesos de entre 187,3 y 197,2 g y valores de pH entre 5,08 y 5,19 a día 1 y entre 4,87 y 5,16 a día 30, mostrando diferencias menores de 0,30 unidades entre los quesos con *Lb. reuteri* con y sin glicerol.

##### 3.7.1.1. Producción de reuterina

Los resultados de producción de reuterina a lo largo de la maduración de los quesos se recogen en la Tabla 30.

**Tabla 30.** Producción de reuterina ( $\mu\text{mol/g}$ ) en quesos inoculados con *Lb. reuteri* INIA P572 como adjunto al CLC y distintas concentraciones de glicerol

Glicerol (mM)	Tiempo (d)					
	1	5	10	15	20	30
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
50	1,05 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,45 <sup>a</sup>
100	4,42 <sup>b</sup>	2,40 <sup>d</sup>	1,85 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>
200	4,71 <sup>b</sup>	2,11 <sup>b</sup>	2,33 <sup>c</sup>	0,96 <sup>b</sup>	1,57 <sup>c</sup>	0,55 <sup>b</sup>
500	4,60 <sup>b</sup>	2,29 <sup>c</sup>	2,41 <sup>c</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,63 <sup>c</sup>	0,53 <sup>b</sup>

<sup>a-d</sup> Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) para el mismo tiempo. ND, no detectado.

En los quesos sin glicerol no se registró producción de reuterina. Con 50 mM se detectaron concentraciones de 1,05 mM. Las concentraciones más altas de reuterina se consiguieron el día 1 en los quesos con concentraciones de glicerol entre 100 y 500 mM, con valores entre 4,42 y 4,71  $\mu\text{mol/g}$ . A continuación se registró un descenso en la concentración del antimicrobiano durante el periodo de maduración estudiado. A los 30 d, los valores fueron inferiores a 0,6  $\mu\text{mol/g}$  (Tabla 30). La cuantificación mediante HPLC a día 1 en quesos con 100-500 mM de glicerol confirmó los valores de reuterina obtenidos por el método colorimétrico, situándose entre 4,12 y 5,28  $\mu\text{mol/g}$ . Sin embargo, no se observó reuterina mediante HPLC en quesos elaborados con 50 mM a día 1 ni en ningún otro queso a partir del día 5 de estudio, debido a que las concentraciones estaban por debajo del límite de detección de esta técnica (2,6  $\mu\text{mol/g}$ ).

Estos resultados indican que la producción de reuterina alcanzó un máximo de 4,5  $\mu\text{mol/g}$  a día 1 en quesos elaborados con 100 mM de glicerol o concentraciones superiores. De acuerdo con nuestros resultados, la concentración de reuterina obtenida en queso fue superior a la detectada en queso tipo Manchego de entre 0,95 y 0,98  $\mu\text{mol/g}$  en quesos de 1 d con glicerol 50 y 100 mM por Gómez-Torres y col., (2014). Estas diferencias podrían atribuirse a la utilización de un sobrenadante de *Lb. reuteri* en la cuantificación realizada, en lugar del empleo de reuterina purificada en el presente trabajo.

### 3.7.1.2. *Lb. reuteri* INIA P572

Los recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 durante la maduración se indican en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 (log ufc/g) en quesos con distintas concentraciones de glicerol

Glicerol (mM)	Tiempo (d)					
	1	5	10	15	20	30
0	6,15 <sup>c</sup>	6,13 <sup>c</sup>	5,97 <sup>c</sup>	5,90 <sup>c</sup>	6,30 <sup>c</sup>	6,34 <sup>c</sup>
50	6,30 <sup>c</sup>	5,55 <sup>c</sup>	5,51 <sup>bc</sup>	5,48 <sup>bc</sup>	5,86 <sup>bc</sup>	5,17 <sup>bc</sup>
100	6,43 <sup>c</sup>	5,38 <sup>c</sup>	5,20 <sup>bc</sup>	5,38 <sup>bc</sup>	5,01 <sup>abc</sup>	4,44 <sup>b</sup>
200	6,33 <sup>c</sup>	4,99 <sup>c</sup>	4,63 <sup>b</sup>	5,01 <sup>b</sup>	4,69 <sup>ab</sup>	4,09 <sup>b</sup>
500	6,47 <sup>c</sup>	5,14 <sup>c</sup>	4,85 <sup>b</sup>	5,06 <sup>b</sup>	4,40 <sup>a</sup>	4,42 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) para el mismo tiempo

En el queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 sin glicerol, los recuentos se mantuvieron constantes a lo largo de los 30 d de maduración estudiados. Sin embargo, disminuyeron significativamente ( $P < 0,01$ ) a partir del día 10 en los quesos a los que se adicionó glicerol, siendo más alto el descenso a mayor concentración de glicerol. En los quesos modelo del presente trabajo también se registró una reducción de los niveles de *Lb. reuteri* y Gómez-Torres y col. (2014) también comprobaron el efecto antimicrobiano de la reuterina frente a los lactobacilos del queso.

### 3.7.1.3. Cultivo láctico iniciador comercial

Los recuentos del cultivo láctico iniciador comercial en los quesos a los que se inoculó *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol a distintas concentraciones se recogen en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Recuentos del CLC (log ufc/g) en los quesos con distintas concentraciones de glicerol

Glicerol (mM)	Tiempo (d)					
	1	5	10	15	20	30
0	9,51 <sup>d</sup>	9,59 <sup>d</sup>	9,71 <sup>d</sup>	9,63 <sup>d</sup>	9,42 <sup>d</sup>	8,73 <sup>d</sup>
50	9,46 <sup>d</sup>	9,43 <sup>d</sup>	9,55 <sup>d</sup>	9,34 <sup>d</sup>	9,30 <sup>d</sup>	8,79 <sup>d</sup>
100	9,40 <sup>d</sup>	7,37 <sup>c</sup>	7,15 <sup>b</sup>	6,16 <sup>c</sup>	4,60 <sup>c</sup>	3,50 <sup>c</sup>
200	9,40 <sup>d</sup>	7,70 <sup>c</sup>	7,61 <sup>c</sup>	4,78 <sup>b</sup>	3,22 <sup>b</sup>	3,07 <sup>c</sup>
500	9,42 <sup>d</sup>	7,87 <sup>c</sup>	7,22 <sup>b</sup>	3,76 <sup>a</sup>	3,69 <sup>bc</sup>	3,45 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) para el mismo tiempo

En el queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 sin glicerol, los recuentos del CLC alcanzaron 9,51 log ufc/g en el día 1 y disminuyeron 0,78 u. log durante los 30 d de maduración. En los quesos con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol 50 mM no hubo diferencias significativas en los recuentos del CLC respecto al queso control durante todo el periodo de maduración estudiado. Los recuentos del CLC en los quesos con glicerol a unas concentraciones entre 100-500 mM fueron muy similares respecto a los valores de los quesos sin glicerol en el día 1. Sin embargo, a partir de los 5 d se registró un descenso en los recuentos a los 30 d que fueron entre 5,23 y 5,66 u. log más bajos que los registrados en los quesos control. En los quesos modelo también se detectó el efecto inhibitorio frente a los lactobacilos del cultivo iniciador y en el queso tipo Manchego se observó un descenso muy similar en los niveles del CLC al añadir *Lb. reuteri* INIA P572 junto con



concentraciones de glicerol 50 y 100 mM (Gómez-Torres y col., 2014). Otros antimicrobianos como la enterocina 4 para inactivar a *L. monocytogenes* en queso también dieron lugar a reducciones del CLC (Nuñez y col., 1997).

#### 3.7.1.4. Color

Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) en el queso no fueron afectados de manera significativa ( $P < 0,01$ ) por el tiempo de maduración. Se detectó un incremento de  $a^*$  durante el periodo de maduración. Los valores de este parámetro fueron negativos o inferiores a 0,65 en todos los quesos excepto en aquellos con *Lb. reuteri* y 200 ó 500 mM que presentaron un aumento hacia el rojo a partir del día 10, con valores de 5,16 y 5,87 a los 30 d, respectivamente. Los valores de  $b^*$  fueron positivos y aumentaron a lo largo de la maduración, alcanzando valores entre 14,35 y 16,12 a los 30 d, sin encontrarse diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre los quesos. Gomez-Torres y col. (2014) también encontraron esta tendencia en el color de los quesos fabricados con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol, que se atribuyó a la posible reacción de la reuterina con otros compuestos del queso. Por otro lado, Angiolillo y col. (2014) comprobaron que la aplicación de una cubierta activa enriquecida con *Lb. reuteri* y glicerol en quesos Fior di Latte no afectó sobre la calidad sensorial del producto, incluido el color. En el presente trabajo no se detectaron cambios en el color al estudiar homogeneizados de queso sin *Lb. reuteri* ni glicerol, a los que se añadieron concentraciones crecientes de reuterina (hasta 20  $\mu\text{mol/g}$ ). Estos resultados sugieren que el desarrollo de una ligera coloración rosa aparecida en los quesos elaborados con las concentraciones más elevadas de glicerol (200 y 500 mM) no sería atribuible a la reacción de la reuterina con otros compuestos del queso, sino que estaría relacionada con alguna sustancia se produce en presencia de concentraciones elevadas de glicerol en el queso. De acuerdo con nuestros resultados, la adición de glicerol 100 mM no afectaría a las propiedades sensoriales del queso en cuanto al color del producto.

### 3.7.2. *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo bioprotector frente a microorganismos patógenos en queso

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de la reuterina producida por el cultivo bioprotector frente a distintos patógenos en queso, se elaboraron quesos a partir de leche inoculada con *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7.

#### 3.7.2.1. Producción de reuterina

Únicamente se detectó reuterina en los quesos con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol 100 mM. La concentración máxima se alcanzó el día 1 con 5,30  $\mu\text{mol/g}$ , a los 7 d se registró una concentración de 2  $\mu\text{mol/g}$  y a partir de los 15 d no se detectó el antimicrobiano. La producción de reuterina registrada en estas fabricaciones fue ligeramente superior a la obtenida en las anteriores (3.7.1.) y bastante más elevada que la detectada por Gómez-Torres y col. (2014) en quesos con glicerol 50 y 100 mM, con valores máximos de 0,98 y 0,95  $\mu\text{mol/g}$ . Sin embargo, en los quesos modelo se obtuvieron valores más altos, lo que se podría atribuir a que no se realizó desuerado, que podría dar lugar a una pérdida de reuterina, ya que en suero Gómez-Torres y col. (2014) comprobaron una concentración de reuterina cuatro veces superior a la del queso.

#### 3.7.2.2. *Lb. reuteri* INIA P572

Los recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 en los quesos se muestran en la Tabla 33.

Los niveles de *Lb. reuteri* INIA P572 fueron muy similares a los detectados en la fabricación anterior. Dichos niveles disminuyeron aproximadamente 1,5 u. log en los quesos con *Lb. reuteri* sin glicerol a lo largo de la maduración, mientras que en los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol 100 mM se registró un descenso de más de 4 u. log, debido a la actividad antimicrobiana de la reuterina.

**Tabla 33.** Recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 (log ufc/g) en quesos inoculados con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo(d)			
	1	7	15	30
Control	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>
Glicerol	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	6,85±0,08 <sup>Ab</sup>	6,13±0,58 <sup>ABc</sup>	5,85±0,50 <sup>ABc</sup>	5,37±0,06 <sup>Bc</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	6,84±0,09 <sup>Ab</sup>	3,52±0,44 <sup>Bb</sup>	3,30±0,47 <sup>Bb</sup>	2,59±0,26 <sup>Bb</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

### 3.7.2.3. Microorganismos viables totales

En la Tabla 34 se recogen los niveles de microorganismos totales.

**Tabla 34.** Recuento de microorganismos totales (log ufc/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	9,42±0,10 <sup>Aa</sup>	9,37±0,08 <sup>Aa</sup>	9,37±0,08 <sup>Aa</sup>	9,14±0,08 <sup>Ba</sup>
Glicerol	9,48±0,12 <sup>Aa</sup>	9,56±0,06 <sup>Aa</sup>	9,56±0,10 <sup>Aa</sup>	9,13±0,05 <sup>Ba</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	9,43±0,07 <sup>Aa</sup>	9,44±0,11 <sup>Aa</sup>	9,42±0,03 <sup>Aa</sup>	9,01±1,28 <sup>Ba</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	9,40±0,12 <sup>Aa</sup>	7,51±0,19 <sup>Bb</sup>	6,24±0,36 <sup>BCb</sup>	4,20±1,28 <sup>Cb</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de TVC en el queso a tiempo 0 h fueron de 9,46 u. log. En los quesos control y los inoculados con *Lb. reuteri* o glicerol de manera individual los recuentos se mantuvieron constantes con un descenso en 30 d de maduración de alrededor de 0,4 unidades. En los quesos dónde se produjo reuterina el descenso fue más acusado, a los 30 d de maduración se registró una disminución en los recuentos superior a 5 u. log. Esta

tendencia fue muy similar a la observada en el estudio de los TVC de la fabricación anterior.

### 3.7.2.4. pH

Los valores de pH se recogen en la Tabla 35.

**Tabla 35.** Valores de pH en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	5,04±0,03 <sup>Ab</sup>	4,85±0,1 <sup>Aa</sup>	4,88±0,03 <sup>Aab</sup>	4,80±0,10 <sup>Aa</sup>
Glicerol	5,08±0,03 <sup>Ac</sup>	4,92±0,05 <sup>Ab</sup>	4,78±0,04 <sup>Aa</sup>	4,76±0,02 <sup>Aa</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	5,09±0,03 <sup>Ac</sup>	4,92±0,03 <sup>Ab</sup>	4,76±0,04 <sup>Aa</sup>	4,78±0,01 <sup>Aa</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	5,08±0,03 <sup>Aa</sup>	5,14±0,02 <sup>Ba</sup>	5,05±0,08 <sup>Ba</sup>	5,05±0,02 <sup>Ba</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de pH se situaron entre 5,04 y 5,09 en el día 1. Se observó un ligero descenso en los quesos control y en los elaborados con glicerol o *Lb. reuteri* de manera individual, de hasta 0,31 unidades en 30 d. Sin embargo en los quesos en los que se produjo reuterina únicamente se registró un descenso de 0,03 unidades en todo el periodo de maduración. Estas diferencias de pH no influirían en el comportamiento de los patógenos en el queso.

### 3.7.2.5. *L. monocytogenes*

Los recuentos de *L. monocytogenes* en la leche inoculada antes de la fabricación fueron de 4,67 log ufc/ml. Los valores registrados durante la maduración se recogen en la Tabla 36.

**Tabla 36.** Recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	6,27±0,39 <sup>Aa</sup>	5,81±0,36 <sup>ABa</sup>	5,01±0,33 <sup>BCa</sup>	4,15±0,29 <sup>Ca</sup>
Glicerol	5,86±0,19 <sup>Aa</sup>	5,76±0,26 <sup>Aa</sup>	4,59±0,06 <sup>Ab</sup>	3,70±0,72 <sup>Ba</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	5,89±0,12 <sup>Aa</sup>	5,59±0,19 <sup>ABa</sup>	4,58±0,39 <sup>BCa</sup>	4,23±0,82 <sup>Ca</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	4,25±0,57 <sup>Ab</sup>	ND <sup>Bb</sup>	ND <sup>Bb</sup>	ND <sup>Bb*</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

A día 1, los niveles de *L. monocytogenes* en queso fabricado con *Lb. reuteri* y glicerol 100 mM fueron 2,02 u. log menores que el queso control. A partir del día 7 no se detectó el patógeno en el queso con reuterina, observándose ausencia en 25 g tras el enriquecimiento de las muestras a los 30 d en una de las dos fabricaciones. Por otro lado, en los quesos control, en los elaborados con glicerol o con *Lb. reuteri* los niveles de *L. monocytogenes* disminuyeron aproximadamente un máximo de 2 u. log a lo largo del periodo de maduración. No se dispone de resultados sobre la actividad antimicrobiana de la reuterina producida en quesos frente a patógenos. Arqués y col. (2004) detectaron actividad bacteriostática con reuterina (8 UA/ml) añadida a la leche frente a *L. monocytogenes* durante 24 h a 37 °C y durante 12 d a 8 °C de almacenamiento. También se observó un ligero efecto antimicrobiano después de 12 d a 4 °C en leche, con un descenso de 0,54 u. log (Arqués y col., 2011). La reuterina añadida a queso tipo cottage a concentraciones más altas, de 50 UA/g redujo los niveles de *L. monocytogenes* 1,5 u. log tras 3 semanas a 7 °C (El-Ziney y Debevere, 1998).

De acuerdo con la legislación europea, los niveles de *L. monocytogenes* en alimentos no deben de exceder 100 log ufc/g durante todo el periodo de vida útil. En los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol este requisito se cumpliría desde el día 1 hasta el final de la maduración. Sin embargo, la legislación norteamericana exige ausencia del patógeno en 25 g. Este criterio se cumpliría en una de las dos fabricaciones efectuadas con *Lb. reuteri* y

glicerol. Sin embargo, es importante señalar que los niveles iniciales de 4,67 log ufc/ml son extremadamente elevados en comparación con los niveles de contaminación en los alimentos de forma natural.

### 3.7.2.6. *E. coli* O157:H7

Los recuentos de *E. coli* O157:H7 en los quesos inoculados con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol y *Lb. reuteri* con glicerol se muestra en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Recuentos de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	5,53±0,57 <sup>Aa</sup>	4,08±0,76 <sup>ABa</sup>	2,38±0,15 <sup>BCa</sup>	0,85±0,98 <sup>Ca</sup>
Glicerol	5,88±0,33 <sup>Aa</sup>	4,59±0,74 <sup>ABa</sup>	2,88±0,57 <sup>Ba</sup>	0,85±0,98 <sup>Ca</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	5,94±0,23 <sup>Aa</sup>	4,91±0,57 <sup>Aa</sup>	2,77±0,23 <sup>Ba</sup>	0,50±1,00 <sup>Ca</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita. ND significa no detectable en 25 g.

Los recuentos de *E. coli* O157:H7 a las 0 h en leche fueron de 5,2 log ufc/ml. En queso control, los niveles de *E. coli* fueron descendiendo a lo largo del periodo de maduración, con valores de 1,76 u. log a día 7 y disminuyendo hasta valores de 0,85 u. log a los 30 d. Esta tendencia se repitió en los quesos con glicerol y en los inoculados con *Lb. reuteri*, que presentaron valores similares a los del control durante la maduración. En los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol únicamente se registró presencia del patógeno en 25 g en queso de 24 h, no detectándose en el resto del periodo de maduración.

La producción de reuterina tuvo un impacto alto sobre la población de *E. coli* O157:H7 en el queso, dando lugar a una inactivación completa del patógeno. En queso tipo cottage con 50 UA/g de reuterina se logró un descenso de 3,5 u. log de *E. coli* EHEC tras 7 d a 7 °C y se necesitaron 150 UA/g para conseguir la inactivación del patógeno (El-Ziney

y Devere, 1998). En leche con reuterina (8 UA/ml) a las 24 h a 37 °C se observó el efecto antimicrobiano frente a *E. coli* O157:H7, con 0,99 u. log menos en las muestras tratadas que en las muestras control a tiempo 0 h (Arqués y col., 2011). En ausencia de reuterina *E. coli* fue capaz de crecer en rangos de pH entre 4,5-6,5, mientras que al añadir 2 y 4 UA/ml de reuterina no se detectó crecimiento a pH 4,5 (Rasch y col., 2002). Según El-Ziney y Devere (1998) la sensibilidad a la reuterina de distintas cepas de *E. coli*, incluyendo la EHEC no difieren significativamente por lo que la efectividad alcanzada en nuestro estudio podría extrapolarse a otras cepas de este patógeno.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la producción *in situ* de pequeñas cantidades de reuterina constituye un sistema eficaz en la inactivación de patógenos en queso. Por tanto, *Lb. reuteri* INIA P572 junto con 100 mM de glicerol podría emplearse como adjunto al cultivo iniciador para mejorar la calidad microbiológica del queso.

### 3.7.3. Efecto de la adición de *Lb. reuteri* y glicerol en las características del queso

Visto el interés de la aplicación de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo protector, se realizaron las siguientes fabricaciones de queso para comprobar su efecto en las características del producto.

#### 3.7.3.1. Producción de reuterina

La concentración de reuterina alcanzada en los quesos con *Lb. reuteri* y 100 mM de glicerol fue de 4,48 µmol/g en el día 1 y de 3,40 µmol/g a los 7 d. Se registró un descenso en la concentración del antimicrobiano con valores de 2 µmol/g a los 15 d y no se detectó durante el resto del periodo de maduración estudiado.

### 3.7.3.2. *Lb. reuteri* INIA P572

Los recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 en los quesos se presentan en la Tabla 38.

**Tabla 38.** Recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 (log ufc/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo(d)			
	1	7	15	30
Control	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>
Glicerol	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>	<1,00 <sup>a</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	5,79±0,94 <sup>Bb</sup>	5,11±0,30 <sup>Ac</sup>	5,17±0,27 <sup>Ab</sup>	5,15±0,67 <sup>Ac</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	6,40±0,21 <sup>Bc</sup>	3,75±0,14 <sup>ABb</sup>	4,37±0,94 <sup>Bb</sup>	2,91±0,26 <sup>Ab</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

Los recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 en los quesos con este cultivo se vieron influidos de manera significativa ( $P < 0,05$ ) por el tiempo, descendiendo ligeramente durante la primera semana de maduración. Esta disminución fue más acusada en los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol, disminuyendo más de 3 u. log en los 30 d de estudio. La inactivación de *Lb. reuteri* se atribuye, como en las fabricaciones anteriores, a la presencia de reuterina en queso.

### 3.7.3.3. Microorganismos totales

El recuento de TVC en los distintos quesos a lo largo de los 30 d de maduración estudiados se muestra en la Tabla 39.

En los quesos control, los niveles de TVC se mantuvieron a lo largo del periodo de maduración, descendiendo sólo 0,3 u. log a los 30 d. Esta tendencia también se registró en los quesos a los que se añadió glicerol y *Lb. reuteri* por separado, descendiendo los recuentos 0,4 y 0,01 u. log, respectivamente, en los 30 d de maduración estudiados. Sin embargo, los quesos en los que se produjo reuterina se observó un descenso más acusado,



de casi 5 u. log durante los 30 d de maduración. Estos datos coinciden con los obtenidos en los quesos a los que se añadieron distintas concentraciones de glicerol para optimizar la producción del antimicrobiano.

**Tabla 39.** Recuento de microorganismos totales (log ufc/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	9,54±0,06 <sup>ABab</sup>	9,47±0,12 <sup>Bab</sup>	9,76±0,01 <sup>Bb</sup>	9,24±0,28 <sup>Ba</sup>
Glicerol	9,63±0,02 <sup>Cb</sup>	9,66±0,09 <sup>Bb</sup>	9,76±0,03 <sup>Bb</sup>	9,22±0,03 <sup>Ba</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	9,46±0,01 <sup>Aa</sup>	9,62±0,12 <sup>Bab</sup>	9,76±0,03 <sup>Bb</sup>	9,45±0,09 <sup>Ba</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	9,57±0,02 <sup>BCb</sup>	8,97±0,1 <sup>Ab</sup>	8,18±0,06 <sup>Ab</sup>	4,64±1,29 <sup>Aa</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

### 3.7.3.4. pH

El pH de los quesos inoculados con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol y su combinación estudiados durante 30 d de maduración se muestra en la Tabla 40.

**Tabla 40.** Valores de pH en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

Quesos	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	5,05±0,08 <sup>Ca</sup>	4,96±0,03 <sup>BCc</sup>	4,89±0,03 <sup>Aab</sup>	4,69±0,08 <sup>Aab</sup>
Glicerol	5,00±0,01 <sup>Ca</sup>	4,82±0,03 <sup>Ba</sup>	4,83±0,10 <sup>Ba</sup>	4,66±0,09 <sup>Aa</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	5,02±0,05 <sup>Ba</sup>	4,89±0,03 <sup>Ab</sup>	4,89±0,06 <sup>Aab</sup>	4,83±0,07 <sup>Ab</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	5,07±0,02 <sup>Ba</sup>	5,05±0,03 <sup>ABd</sup>	5,00±0,06 <sup>ABb</sup>	4,98±0,03 <sup>Ac</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

Los valores de pH oscilaron entre 5,00 y 5,07 el día 1 y entre 4,66 y 4,98 al final del periodo de maduración. El pH disminuyó 0,36 unidades a lo largo de los 30 d en los quesos sin reuterina. En los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol el descenso de pH fue menor, de 0,09

unidades a lo largo del proceso. A los 30 d, los valores de pH en queso con *Lb. reuteri* y glicerol fueron significativamente más elevados ( $P < 0,05$ ) que en los quesos control. El impacto de la reuterina en los niveles de microorganismos totales y por tanto en las bacterias del cultivo iniciador puede considerarse bajo, ya que no se detectaron diferencias de pH en las primeras 24 h, en que se produce el descenso más acusado de pH por acción de las bacterias lácticas del CLC, diferencias en el pH. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en queso cottage con reuterina, en que se registró una reducción de 0,06 unidades tras 21 d de maduración a 7 °C y de 0,4 unidades en el queso control sin reuterina (El-Ziney y Devebere, 1998).

### 3.7.3.5. Proteolisis

El contenido de las principales fracciones proteicas durante la maduración del queso se recoge en la Tabla 41. A día 1 no se detectaron diferencias significativas entre las fracciones proteicas de los cuatro tipos de queso. Sin embargo, a los 7 d los quesos inoculados con *Lb. reuteri* y *Lb. reuteri* + glicerol mostraron en general valores significativamente más bajos ( $P < 0,05$ ) para  $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN y para- $\kappa$ -CN. Al final del periodo de maduración, los quesos con reuterina presentaron valores algo menores de diferentes fracciones proteicas que los quesos control siendo también más bajo el contenido en  $\gamma$ -CN con respecto al queso control. Este fenómeno podría explicarse por el descenso en los quesos a lo largo de la maduración de los microorganismos aerobios totales, fenómeno que ya se había observado en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol (Gómez-Torres y col., 2014). El impacto de *Lb. reuteri* en la proteolisis es difícil de evaluar, ya que se adicionaron en niveles bastante bajos como para afectar a este proceso. La actividad antimicrobiana de la reuterina podría aumentar la proteolisis debido a la liberación a la matriz del queso de enzimas intracelulares presentes en los lactococos del cultivo iniciador, hecho que pudiera relacionarse con la menor concentración de caseínas residuales a lo largo de la maduración. Sin embargo, la concentración de  $\gamma$ -CN que debería de aumentar con la proteolisis también fue menor en los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol.

## Resultados y discusión

**Tabla 41.** Principales fracciones proteicas (mg/g) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

Queso	Tiempo (d)	Fracciones proteicas				
		$\alpha$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	para- $\kappa$ -CN	$\gamma$ -CN
Control	1	49,91 $\pm$ 7,08 <sup>Ca</sup>	54,77 $\pm$ 6,89 <sup>Ca</sup>	13,92 $\pm$ 2,61 <sup>Ba</sup>	8,87 $\pm$ 1,14 <sup>Ba</sup>	1,15 $\pm$ 0,12 <sup>Aa</sup>
	7	37,47 $\pm$ 1,26 <sup>Bb</sup>	46,00 $\pm$ 1,26 <sup>BCb</sup>	10,82 $\pm$ 0,30 <sup>Bab</sup>	7,97 $\pm$ 0,20 <sup>Bab</sup>	1,07 $\pm$ 0,07 <sup>Aab</sup>
	15	24,59 $\pm$ 2,70 <sup>Aa</sup>	35,35 $\pm$ 3,41 <sup>ABa</sup>	6,44 $\pm$ 0,43 <sup>Aa</sup>	5,62 $\pm$ 0,38 <sup>Aa</sup>	3,33 $\pm$ 0,26 <sup>Bb</sup>
	30	18,14 $\pm$ 2,90 <sup>Aab</sup>	26,74 $\pm$ 3,23 <sup>Ab</sup>	6,31 $\pm$ 0,68 <sup>Ab</sup>	5,47 $\pm$ 0,60 <sup>Ab</sup>	6,01 $\pm$ 0,47 <sup>Cb</sup>
Glicerol	1	46,93 $\pm$ 6,27 <sup>Ca</sup>	54,10 $\pm$ 8,54 <sup>Ca</sup>	11,47 $\pm$ 3,53 <sup>Ba</sup>	10,18 $\pm$ 1,97 <sup>Ca</sup>	1,39 $\pm$ 0,21 <sup>Aa</sup>
	7	36,52 $\pm$ 3,93 <sup>BCb</sup>	45,71 $\pm$ 4,51 <sup>BCb</sup>	12,96 $\pm$ 2,76 <sup>Bb</sup>	9,47 $\pm$ 2,11 <sup>BCb</sup>	1,24 $\pm$ 0,26 <sup>Ab</sup>
	15	26,10 $\pm$ 1,11 <sup>ABa</sup>	31,55 $\pm$ 1,53 <sup>ABa</sup>	7,42 $\pm$ 0,57 <sup>ABa</sup>	5,81 $\pm$ 0,34 <sup>ABa</sup>	3,37 $\pm$ 0,22 <sup>Bb</sup>
	30	18,31 $\pm$ 1,38 <sup>Aab</sup>	25,94 $\pm$ 3,20 <sup>Aab</sup>	6,20 $\pm$ 0,72 <sup>Ab</sup>	4,60 $\pm$ 0,41 <sup>Aab</sup>	5,43 $\pm$ 0,41 <sup>Cb</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	1	35,40 $\pm$ 1,28 <sup>Da</sup>	38,57 $\pm$ 1,29 <sup>Ba</sup>	10,11 $\pm$ 0,46 <sup>Ca</sup>	7,45 $\pm$ 0,23 <sup>Ba</sup>	0,99 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>
	7	29,49 $\pm$ 0,86 <sup>Ca</sup>	36,43 $\pm$ 1,56 <sup>Ba</sup>	8,06 $\pm$ 0,38 <sup>Ba</sup>	6,43 $\pm$ 0,39 <sup>Aab</sup>	0,95 $\pm$ 0,07 <sup>Aab</sup>
	15	24,83 $\pm$ 1,36 <sup>Ba</sup>	31,39 $\pm$ 1,50 <sup>Aa</sup>	7,02 $\pm$ 0,38 <sup>ABa</sup>	5,47 $\pm$ 0,38 <sup>Aa</sup>	3,55 $\pm$ 0,35 <sup>Bb</sup>
	30	20,62 $\pm$ 1,02 <sup>Ab</sup>	30,16 $\pm$ 1,04 <sup>Ab</sup>	6,55 $\pm$ 0,33 <sup>Ab</sup>	5,83 $\pm$ 0,29 <sup>Ab</sup>	7,02 $\pm$ 0,23 <sup>Cc</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	1	47,57 $\pm$ 5,80 <sup>Ca</sup>	51,96 $\pm$ 5,72 <sup>Ca</sup>	14,50 $\pm$ 2,52 <sup>Ca</sup>	10,75 $\pm$ 1,90 <sup>Ba</sup>	1,31 $\pm$ 0,21 <sup>Aa</sup>
	7	26,39 $\pm$ 1,39 <sup>Ba</sup>	35,88 $\pm$ 1,46 <sup>Ba</sup>	6,76 $\pm$ 0,41 <sup>Ba</sup>	5,96 $\pm$ 0,17 <sup>Aa</sup>	0,76 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>
	15	24,55 $\pm$ 3,11 <sup>Ba</sup>	32,77 $\pm$ 2,80 <sup>Ba</sup>	6,18 $\pm$ 1,11 <sup>ABa</sup>	5,89 $\pm$ 0,62 <sup>Aa</sup>	2,38 $\pm$ 0,24 <sup>Ba</sup>
	30	14,03 $\pm$ 0,96 <sup>Aa</sup>	17,87 $\pm$ 3,37 <sup>Aa</sup>	2,50 $\pm$ 0,20 <sup>Aa</sup>	3,90 $\pm$ 0,30 <sup>Aa</sup>	3,35 $\pm$ 0,19 <sup>Ca</sup>

Los valores expresan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras triplicadas de dos experimentos independientes. Medias con distinta mayúscula entre distintos tiempos para cada tratamiento difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). Medias con distinta minúscula entre distintos tratamientos para cada tiempo difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Se determinó también la actividad proteolítica total en el queso mediante el ensayo con OPA (Tabla 42).

**Tabla 42.** Proteolisis total (A340 nm) en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

Quesos	Tiempo (d)			
	1	7	15	21
Control	0,176±0,007 <sup>Ac</sup>	0,272±0,009 <sup>Bbc</sup>	0,336±0,015 <sup>Cb</sup>	0,457±0,043 <sup>Db</sup>
Glicerol	0,159±0,018 <sup>Aab</sup>	0,256±0,011 <sup>Bb</sup>	0,303±0,006 <sup>Ca</sup>	0,429±0,025 <sup>Db</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	0,169±0,005 <sup>Abc</sup>	0,285±0,021 <sup>Bc</sup>	0,347±0,013 <sup>Cb</sup>	0,467±0,029 <sup>Db</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	0,149±0,007 <sup>Aa</sup>	0,213±0,002 <sup>Ba</sup>	0,294±0,006 <sup>Ca</sup>	0,358±0,018 <sup>Da</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes. Los valores dentro de la misma fila con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ). Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) para la temperatura descrita.

Los resultados obtenidos con este ensayo resultaron contradictorios respecto a los menores niveles de caseína residual de los quesos. Durante la maduración, la menor proteolisis observada en los quesos con reuterina indicaría una menor intensidad en este proceso. Durante la proteolisis del queso, las proteínas son degradadas a productos primarios (polipéptidos) y posteriormente a productos secundarios como péptidos de tamaño medio y pequeño, y finalmente a aminoácidos libres (Desmazeaud y Gripon, 1977). De acuerdo con nuestros resultados de determinación de la proteolisis total mediante OPA, durante la maduración fue incrementándose la concentración de aminoácidos, con un aumento menor en los quesos con reuterina posiblemente por la inactivación del cultivo iniciador comercial y por tanto, de los niveles de enzimas implicadas en la proteolisis. También otras enzimas como el cuajo y las proteinasas de la leche podrían resultar afectadas por la reuterina presente en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol. Según Tungjaroenchai y col. (2004) la actividad aminopeptidásica observada en quesos Edam al que se añadió *Lb. reuteri* ATCC 23272 como adjunto al CLC fue también menor que en los quesos control.

### 3.7.3.6. Compuestos volátiles

La evolución de los compuestos volátiles en los quesos a los que se añadió *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y el lactobacilo junto con glicerol se muestra en la Tabla 42. La extracción y caracterización de compuestos volátiles permitió la identificación de 40

compuestos que se agruparon en ocho familias (alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres, hidrocarburos, cetonas, compuestos sulfurados y terpenos). Destaca un aumento muy significativo de los aldehídos en los quesos con *Lb. reuteri* y glicerol debido a la producción de reuterina de naturaleza aldehídica y a la evolución de este compuesto. En los quesos con *Lb. reuteri* se detectaron compuestos como 2-propenal, 2-propenol, 1-propanol y propenal que podrían derivar de enzimas relacionados con la producción de reuterina en presencia de 1,2-propanediol en lugar de glicerol. Los compuestos sulfurados detectados en los quesos a los que se adicionó *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol fueron significativamente menores, lo que podría relacionarse con la menor proteólisis, un contenido menor en aminoácidos y por tanto menos degradación de aminoácidos azufrados. En el caso de los alcoholes, se registró un aumento en los quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, más acusado todavía en aquellos a los que también se añadió glicerol. Los alcoholes pueden provenir de la degradación de los ácidos grasos libres, bien por la  $\beta$ -oxidación de los  $\beta$ -cetoácidos o bien por la transformación de los ácidos grasos a aldehídos y estos a su vez a alcoholes. Los compuestos de procedencia alcohólica aportan aroma a fresco, frutales y herbáceos (Flórez y col., 2006; Voigt y col., 2010). Los compuestos pertenecientes a la familia de las cetonas aumentaron en los quesos con reuterina, observándose un aumento muy significativo desde el día 7 hasta el día 30. Las cetonas son compuestos característicos de algunas variedades de queso y proceden principalmente de la  $\beta$ -oxidación parcial de los ácidos grasos libres, aportando a este alimento aromas frutales y florales (Molimard y Spinnler, 1996; Curioni y Bosset, 2002, Spinnler y Gripon, 2004). El hecho de que estos dos grupos químicos sean los que mayor concentración presentan en los quesos con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol estaría relacionado, ya que su origen es muy parecido. En un trabajo en el que se utilizaron *Lb. paracasei*, *casei* y *curvatus* como cultivos adjuntos al cultivo iniciador, se observaron en los quesos niveles superiores de cetonas y alcoholes, coincidiendo con nuestros resultados (Di Cagno y col., 2011). Los alcoholes y las cetonas se situaron también entre los grupos con mayor concentración en quesos tipo azul y quesos de leche de vaca cruda (Calzada y col., 2013a y 2015).

Tabla 43. Compuestos volátiles en quesos con *Lb. reuteri* INIA P572, glicerol 100 mM y *Lb. reuteri* con glicerol

Quesos	Tiempo (d)	Familias de compuestos							
		Alcoholes	Aldehídos	Ácidos	Ésteres	Hidrocarburos	Cetonas	Compuestos sulfurados	Terpenos
Control	7	532,12±28,89 <sup>Aa</sup>	0,86±0,27 <sup>Aa</sup>	128,59±13,76 <sup>Ca</sup>	5,09±0,59 <sup>Ab</sup>	44,86±6,40 <sup>Ba</sup>	238,18±74,71 <sup>Aa</sup>	25,53±12,94 <sup>Ba</sup>	908,33±213,44 <sup>Aa</sup>
	30	514,70±39,23 <sup>Aa</sup>	1,64±0,29 <sup>Ba</sup>	162,60±30 <sup>Aa</sup>	7,05±0,46 <sup>Bb</sup>	34,92±3,78 <sup>Aa</sup>	262,17±116,45 <sup>Aa</sup>	39,89±32,15 <sup>Aa</sup>	820,83±87,58 <sup>Aa</sup>
Glicerol	7	564,47±24,63 <sup>Aa</sup>	0,83±0,10 <sup>Aa</sup>	119,69±15,97 <sup>BCa</sup>	5,46±0,57 <sup>Aa</sup>	41,93±5,42 <sup>Aa</sup>	253,30±96,10 <sup>Aa</sup>	18,71±9,84 <sup>BAa</sup>	904,55±70,12 <sup>Aa</sup>
	30	512,01±41,05 <sup>Aa</sup>	1,46±0,22 <sup>Ba</sup>	156,88±21,42 <sup>Ba</sup>	6,85±1,25 <sup>Ab</sup>	36,04±4,66 <sup>Aa</sup>	222,83±89,94 <sup>Aa</sup>	24,94±10,48 <sup>Aa</sup>	757,30±50,18 <sup>Aa</sup>
<i>Lb. reuteri</i>	7	771,07±121,16 <sup>Ba</sup>	2,97±2,30 <sup>Aa</sup>	83,91±18,45 <sup>ABa</sup>	4,56±0,83 <sup>Aa</sup>	39,83±3,31 <sup>Aa</sup>	333,52±27,01 <sup>Aa</sup>	15,43±6,93 <sup>ABa</sup>	852,31±93,72 <sup>Aa</sup>
	30	965,21±329,52 <sup>Ba</sup>	4,13±3,10 <sup>Aa</sup>	153,91±17,22 <sup>Ba</sup>	6,33±1,18 <sup>ABa</sup>	32,2±2,52 <sup>Aa</sup>	244,32±245,73 <sup>Aa</sup>	23,94±13,92 <sup>Aa</sup>	807,33±127,68 <sup>Aa</sup>
<i>Lb. reuteri</i> + glic	7	974,29±25,31 <sup>Ca</sup>	125,97±14,26 <sup>Ab</sup>	81,09±20,62 <sup>Aa</sup>	4,66±0,29 <sup>Aa</sup>	39,20±6,13 <sup>Aa</sup>	951,50 68,17 <sup>Ba</sup>	4,24±1,02 <sup>Aa</sup>	921,86±98,33 <sup>Aa</sup>
	30	986,20±68,58 <sup>ABa</sup>	105,18±14,19 <sup>Ab</sup>	140,99±17,85 <sup>Ba</sup>	4,54±0,47 <sup>Aa</sup>	32,45±4,92 <sup>Aa</sup>	1973,84±197,08 <sup>Bb</sup>	3,39±0,61 <sup>Aa</sup>	975,14±154,04 <sup>Aa</sup>

Los valores expresan la media ± desviación estándar de muestras duplicadas de dos experimentos independientes, e indican la abundancia relativa respecto al patrón interno. Los valores dentro de la misma columna con distinta mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para un mismo queso. Los valores dentro de la misma columna con distinta minúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) para el mismo tiempo.

La degradación de las proteínas de la leche constituye uno de los principales procesos durante la maduración de los quesos, interviniendo en la textura final del producto como consecuencia de la degradación de la trama proteica del coágulo (De Jong, 1978), así como en el desarrollo de aromas y sabores por la liberación de péptidos y aminoácidos a partir de la caseína de la leche, que actúan como precursores del aroma (Thomas y Pritchard, 1987).

### 3.8. PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE *Lb. REUTERI* INIA P572

Tras el estudio de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo bioprotector, se han estudiado las propiedades de esta cepa como probiótico. En primer lugar ha sido comprobar cómo se comporta bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* y posteriormente en un simulador de colon. Se ha investigado su efecto sobre la respuesta inmunitaria mediante el empleo de una línea celular de macrófagos murinosen, así como sobre diversos parámetros relacionados con la actividad inflamatoria en un modelo murino de colitis experimental.

#### 3.8.1. Supervivencia a condiciones gastrointestinales

*Lb. reuteri* INIA P572 mostró una elevada resistencia a las condiciones gástricas de pH 3,0, con recuentos similares a los iniciales. La exposición consecutiva a pH 8,0 en presencia de sales biliares redujo los recuentos de esta cepa en menos de 0,3 u. log. (Fig. 26). Por lo tanto, podemos decir que *Lb. reuteri* INIA P572 presenta una alta supervivencia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* ensayadas. Este tipo de ensayo se ha empleado en distintos estudios cuyo objetivo es buscar nuevas cepas probióticas (Fernández y col., 2014; Rodríguez y col., 2003, 2012). Esta característica es dependiente de cepa en la evaluación de un microorganismo probiótico (Gasser, 1994; Donohue y Salminen, 1996; Vinderola y Reinheimer, 2003).

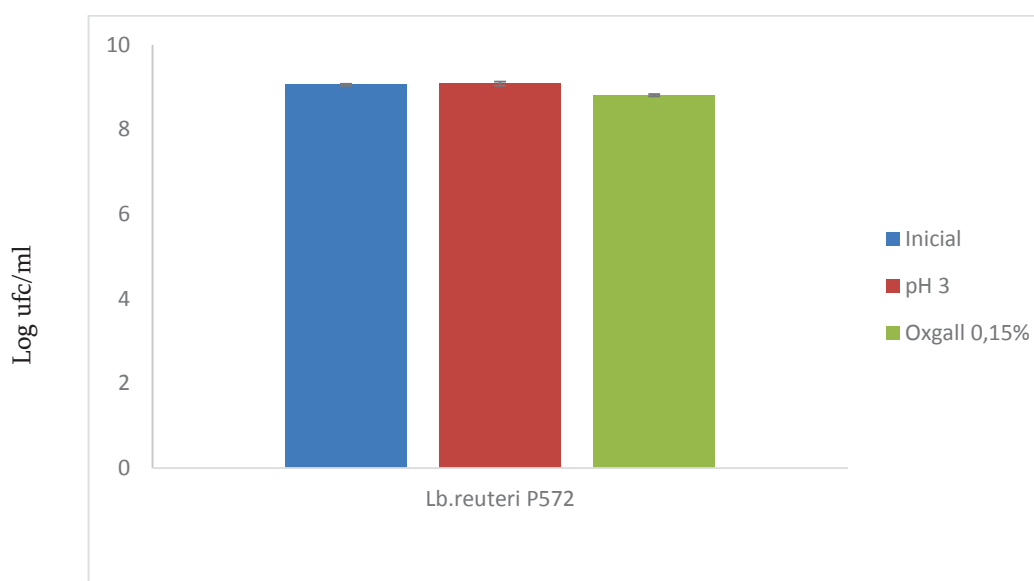


Figura 26. Gráfico de recuento de *Lb. reuteri* INIA P572 sometido a condiciones gastrointestinales

Los microorganismos probióticos deben mantenerse metabólicamente activos para poder ejercer sus potenciales efectos beneficiosos. Esto se traduce en la importancia que tiene la viabilidad de las bacterias probióticas a su paso por el aparato digestivo, pudiendo equilibrar así la microbiota intestinal (Nomoto, 2005). Además, las células viables confieren una estimulación mucho mayor de la inmunidad intestinal en los huéspedes que las bacterias no viables (Galdeano y Perdígón, 2004). *Lb. reuteri* INIA P572 muestra una alta viabilidad en condiciones gastrointestinales, reforzando su potencial como microorganismo probiótico.

### 3.8.2. Producción de reuterina en un modelo de simulación de colon *in vitro*

#### 3.8.2.1. Producción de reuterina

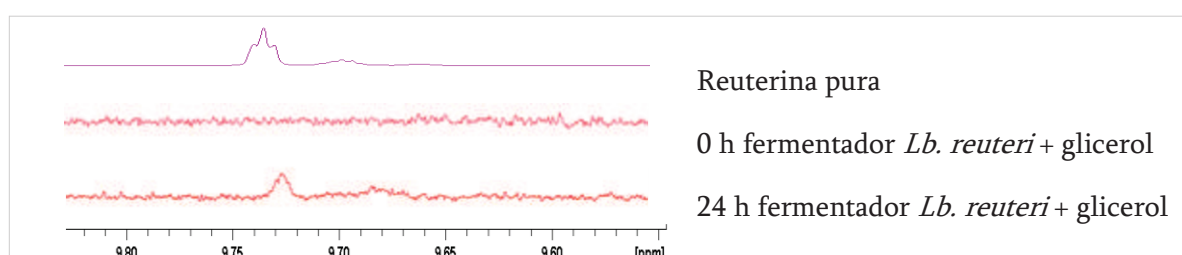
La producción de reuterina en el modelo de colon estudiado se determinó mediante el método colorimétrico de Circle y col. (1945) y por  $^1\text{H}$  RMN. Se realizaron análisis por el método de Circle a las 0, 6 y 24 h de los fermentados con *Lb. reuteri* INIA P572 y con *Lb. reuteri* y glicerol 100 mM. A las 0 h no se detectó presencia de reuterina en ninguno de los fermentadores. Sin embargo, a las 6 y 24 h se observó desarrollo de color en los ensayos con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol 100 mM. Con este método no se pudo cuantificar la reuterina debido a que el color del medio de fermentación dificultó la realización de la



recta patrón. De Weirdt y col. (2012) añadieron *Lb. reuteri* y glicerol 40 mM a un cultivo celular y comprobaron la producción de reuterina según Vollenweider y col. (2003).

La producción de reuterina en el modelo de colon *in vitro* se confirmó mediante  $^1\text{H}$  RMN. No se detectó reuterina ni a las 0 ni a las 24 h en el fermentador al que únicamente se había añadido *Lb. reuteri* INIA P572, mientras que si se observó a las 24 h en el fermentador con el *Lb. reuteri* productor de reuterina y glicerol 100 mM (Fig. 27).

Figura 27. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del patrón de reuterina, y el fermentador dónde se produjo reuterina *in situ* a las 0 y a las 24 h de estudio



De Weirdt y col. (2010) estudiaron la producción de reuterina en un simulador intestinal añadiendo a un medio de fermentación similar al empleado en nuestro trabajo únicamente glicerol 40 y 140 mM. En este estudio se detectó 1,3-PDO (tienes que poner en la intro que es el PDO), por lo que se propuso la metabolización del glicerol vía reuterina, aunque ésta no fuera detectada en los ensayos mediante HPLC.

Microorganismos de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium* y *Lactobacillus* (Schütz y Radler, 1984; Homann y col., 1990; Talarico y col., 1990; Biebl y col., 1992; Dabrock y col., 1992; Barbirato y col., 1995; Sauvageot y col., 2000) son capaces de producir reuterina como metabolito intermediario de la bioconversión anaeróbica del glicerol. Mientras que muchas especies reductoras de glicerol reducen de forma inmediata los productos intermediarios mediante oxidorreductasas NAD dependientes obteniendo como producto final 1,3-PDO (Biebl y col., 1999), los lactobacilos productores de reuterina son capaces de acumular y secretar esta sustancia de manera extracelular (Sauvageot y col., 2000; Martin y col., 2005; Garai-Ibabe y col., 2008; Bauer y col., 2010). Este hecho depende de la cantidad de carbohidratos fermentables disponibles en el medio. Entre todos estos

lactobacilos, es *Lb. reuteri* el que mayor eficiencia presenta secretar reuterina (Talarico y col., 1988; Lüthi-Peng y col., 2002; Vollenweider y col., 2003). Morita y col. (2008) demostraron la producción de reuterina *ex vivo* en intestino de ratón con una concentración entre 7-10 mM de glicerol. En nuestro modelo de simulación de colon se demuestra la producción de reuterina al incorporar al medio de fermentación fecal la cepa productora *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol.

### 3.8.2.2. Supervivencia de *Lb. reuteri* INIA P572

Los recuentos de *Lb. reuteri* INIA P572 obtenidos tras adicionarlo al fermentador con la microbiota humana del donante se pueden observar en la Tabla 44.

**Tabla 44.** Recuento de *Lb. reuteri* INIA P572 tras fermentación durante 24 h en el simulador de colon

Fermentador	Tiempo	<i>Lb. reuteri</i> INIA P572
<i>Lb. reuteri</i>	0 h	6,32±0,70 <sup>A</sup>
	6 h	7,42±0,24 <sup>A</sup>
	24 h	7,21±0,51 <sup>A</sup>
<i>Lb. reuteri</i> +glic	0 h	6,27±0,63 <sup>A</sup>
	6 h	7,29±0,20 <sup>B</sup>
	24 h	7,28±0,26 <sup>AB</sup>

<sup>A-B</sup>. Las letras mayúsculas significan diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre distintos tiempos dentro del mismo fermentador

Los niveles de *Lb. reuteri* aumentaron a las 6 h aproximadamente 1 u. log en los dos fermentadores, añadiendo o no glicerol. Estos niveles se mantuvieron, o descendieron ligeramente en el caso del fermentador inoculado sólo con *Lb. reuteri* INIA P572, a las 24 h de estudio. Según estos resultados, la microbiota del donante no parece repercutir negativamente sobre el *Lb. reuteri* productor de reuterina. El glicerol tampoco habría modificado los recuentos de *Lb. reuteri* a pesar de la producción de reuterina.

De Weird y col. (2012) evaluaron el efecto de *Lb. reuteri* ATCC PTA 6475 frente a la infección por *Salmonella* Typhimurium en un modelo de epitelio de colon humano. La

exposición a corto plazo de *Lb. reuteri* y glicerol 100 mM no afectó a las células de epitelio de colon humano estudiadas, a pesar que hubo producción *in situ* de reuterina. Los recuentos de *Lb. reuteri* en el modelo tampoco se vieron afectados por la producción de reuterina. De acuerdo con nuestros resultados *Lb. reuteri* INIA P572 es capaz de sobrevivir y producir reuterina en las condiciones gastrointestinales del modelo ensayado, reforzando su potencial probiótico.

### 3.8.2.3. Supervivencia de las bacterias de la microbiota

Los resultados obtenidos en las poblaciones de la microbiota humana estudiadas tras la fermentación durante 24 h a pH 7,0 en el simulador de colon con *Lb. reuteri* INIA P572 en presencia y ausencia de glicerol se muestran en la Tabla 45. Todas las poblaciones microbianas mostraron la misma tendencia en ambos fermentadores. Los bacteroides aumentaron 1 u. log tras 24 h de estudio, las bifidobacterias aumentaron en más de 1 u. log de las 0 a las 6 h, manteniéndose los recuentos por encima de 9 u. log a las 24 h. Los clostridios, al igual que las enterobacterias, presentaron el aumento más progresivo. La concentración alcanzada por los lactobacilos fue de poco más de 7 u. log a las 24 h de estudio. Los recuentos de los microorganismos totales aerobios y los anaerobios fueron similares, alcanzándose más de 9 u. log a las 24 h de fermentación.

Son varios los estudios realizados en los que se han evaluado estas familias de microorganismos en modelos de fermentación colónica (De Boever y col., 2000; Vardakou y col., 2008; Filocamo y col., 2012). Según Cleusix y col. (2007) los recuentos de lactobacilos, bifidobacterias y bacterioides, no variaron al ser sometidos a unas condiciones intestinales simuladas durante periodos de tiempos más prolongados que los del presente trabajo. La adición de *Lb. reuteri* ATCC 55730 junto con concentraciones de glicerol 10 y 100 mM dio lugar a recuentos microbianos similares a los observados en nuestro trabajo.

*Lb. reuteri* INIA P572 no presenta claras competencias con varios de los grupos mayoritarios de nuestro intestino. La adición de esta BAL con i sin glicerol 100 mM no afectó los recuentos de la microbiota estudiada. Estos resultados indican que el empleo de

*Lb. reuteri* INIA P572 como microorganismo probiótico no afectaría de manera sustancial la microbiota habitual del hospedador.

## Resultados y discusión

**Tabla 45.** Recuento de las poblaciones de la microbiota humana (log ufc/ml) en un simulador de colon junto con *Lb. reuteri* INIA P572 adicionado individualmente o en combinación con glicerol

Fermentador	Tiempo	Bacteroides	Bífidobacterias	Clostridios	Enterobacterias	Lactobacilos	Aerobios	Anaerobios
<i>Lb. reuteri</i>	0 h	6,85±0,24 <sup>A</sup>	7,34±0,02 <sup>A</sup>	6,72±0,87 <sup>A</sup>	6,38±0,08 <sup>A</sup>	6,46±0,56 <sup>A</sup>	7,19±0,12 <sup>A</sup>	7,58±0,18 <sup>A</sup>
	6 h	7,12±0,04 <sup>A</sup>	9,18±0,18 <sup>B</sup>	7,14±0,79 <sup>A</sup>	9,16±0,18 <sup>B</sup>	7,42±0,21 <sup>B</sup>	9,13±0,23 <sup>B</sup>	9,16±0,13 <sup>B</sup>
	24 h	8,45±0,21 <sup>B</sup>	9,26±0,18 <sup>B</sup>	8,37±0,11 <sup>A</sup>	9,25±0,16 <sup>B</sup>	7,28±0,19 <sup>AB</sup>	9,32±0,05 <sup>B</sup>	9,31±0,09 <sup>B</sup>
<i>Lb. reuteri</i> +glic	0 h	7,23±0,30 <sup>A</sup>	7,96±1,17 <sup>A</sup>	6,86±0,69 <sup>A</sup>	6,07±0,51 <sup>A</sup>	6,41±0,55 <sup>A</sup>	7,38±0,10 <sup>A</sup>	7,46±0,08 <sup>A</sup>
	6 h	7,41±0,21 <sup>A</sup>	9,19±0,18 <sup>A</sup>	7,65±0,38 <sup>AB</sup>	9,27±0,25 <sup>B</sup>	7,29±0,20 <sup>B</sup>	8,83±0,43 <sup>B</sup>	9,15±0,23 <sup>B</sup>
	24 h	8,48±0,21 <sup>B</sup>	9,43±0,18 <sup>A</sup>	8,68±0,18 <sup>B</sup>	9,38±0,17 <sup>B</sup>	7,07±0,58 <sup>B</sup>	9,44±0,16 <sup>B</sup>	9,45±0,10 <sup>B</sup>

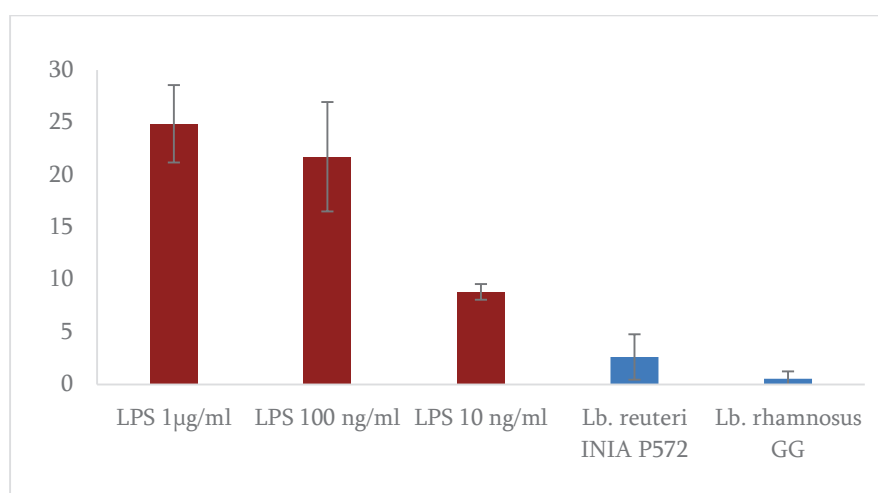
<sup>A-B</sup>. Las letras mayúsculas indican si ha habido diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre un mismo grupo microbiano para distinto tiempo

### 3.8.3. Actividad inmunomoduladora en cultivos celulares de macrófagos RAW 264.7

#### 3.8.3.1. Producción de NO

La incubación durante 24 h de los macrófagos con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG dieron lugar a concentraciones de NO de 2,64 y 0,56  $\mu$ M, respectivamente. Como control positivo de la producción de NO, las células se estimularon con 10, 100 y 1000 ng/ml LPS, observándose valores de entre 8,83 y 24,86  $\mu$ M (Fig. 28).

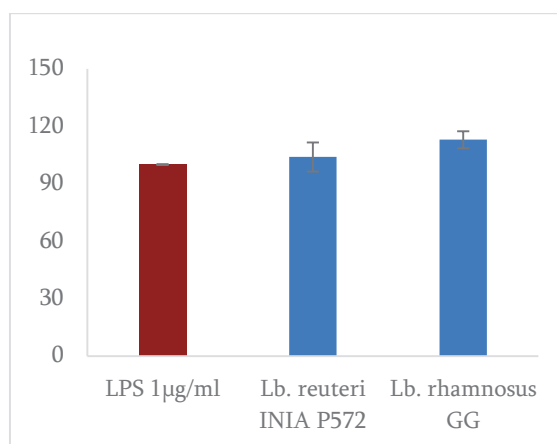
**Figura 28.** Producción de NO ( $\mu$ g/ml) en un cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 estimulado con LPS (1  $\mu$ g/ml, 100 y 10 ng/ml), *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG



En el estudio de la estimulación de la producción de NO por parte de otras bacterias probióticas como *Lb. plantarum* (Chon y col., 2009) o sustancias bioactivas (Moro y col., 2012) en la misma línea celular se detectaron valores muy inferiores a los producidos por la estimulación con LPS, al igual que lo observado en nuestro estudio (Fig. 28).

Del mismo modo se determinó la producción de NO al añadir LPS (1  $\mu$ g/ml) a un cultivo celular de macrófagos murinos RAW 264.7 previamente estimulado durante 1 h con *Lb. reuteri* INIA P572, *Lb. rhamnosus* GG. El resultado expresado como porcentajes de producción de NO considerando el control por LPS el 100 % se muestran la Fig. 29.

**Figura 29.** Producción de NO ( $\mu\text{g/ml}$ ) en un cultivo celular de macrófagos RAW 264 incubados con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG durante 1 h y estimulados posteriormente con LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )

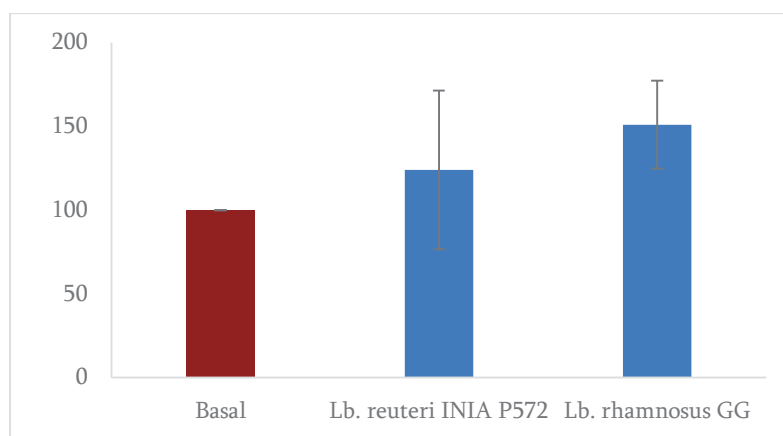


El NO es uno de los mediadores más importantes relacionados con la presencia de microorganismos patógenos dentro del sistema inmunitario, participa en la inflamación y en la destrucción de tejidos en procesos autoinmunes (Yamashita y col., 1997). Otras células del sistema inmunitario encargadas de producir las especies reactivas del oxígeno que pueden dar lugar al NO son los leucocitos y las citoquinas. El NO se produce en respuesta a citoquinas como TNF- $\alpha$  mediante la estimulación de la expresión de la óxido nítrico sintetasa y actuando en como respuesta a la presencia de LPS (Tejada-Simón y Pestka, 1999). Según observó Chon y col. (2009) en el estudio de las propiedades probióticas de *Lb. plantarum* KFCC11389P, la producción de NO al añadir LPS ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) a células RAW 264.7 previamente tratadas con la bacteria probiótica, fue ligeramente superior a la producción detectada al añadir LPS en ausencia del probiótico. Estos resultados son similares a los observados en nuestros ensayos con las cepas *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG (Fig. 29). La producción de NO en ensayos con distintas cepas de *Lb. plantarum* fue muy superior cuando se emplearon células viables respecto a la estimulación con células inactivadas por calor. La utilización de células viables se acercaría más a una situación real del uso de probióticos capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal.

### 2.8.3.2. Viabilidad celular

Tras la incubación de *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG con los macrófagos durante 24 h a 37 °C, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Los resultados se expresan en % de viabilidad respecto del basal (100%) (Fig. 30).

**Figura 30.** Viabilidad celular (%) de macrófagos murinos RAW 264.7 frente a *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG



Se observó un aumento de la viabilidad celular del 24 y 51% en *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG, respectivamente. Este aumento podría implicar la estimulación de la proliferación y/o de la actividad celular. El método de MTT se utiliza para evaluar la citotoxicidad de bacterias y compuestos bioactivos, midiendo la actividad mitocondrial (Chen y col., 2002; Chon y col., 2009; Moro y col., 2012).

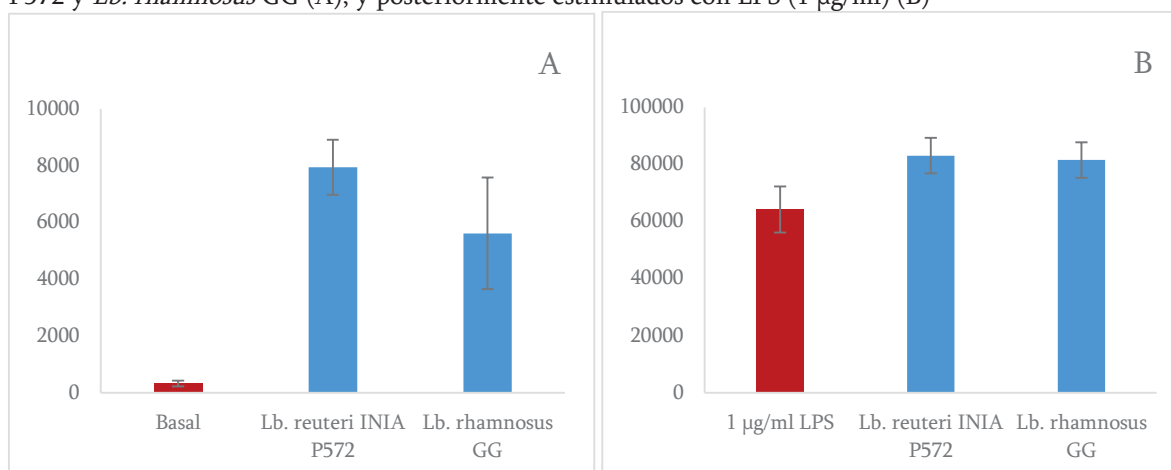
### 3.8.3.3. Producción de citoquinas

#### TNF- $\alpha$

El efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* sobre la producción de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en la línea de macrófagos RAW 264.7 posteriormente estimulados o no con LPS (1  $\mu$ g/ml) fue determinada mediante ELISA y se muestran en la Fig. 31.



**Figura 31.** Producción de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG (A), y posteriormente estimulados con LPS (1  $\mu$ g/ml) (B)



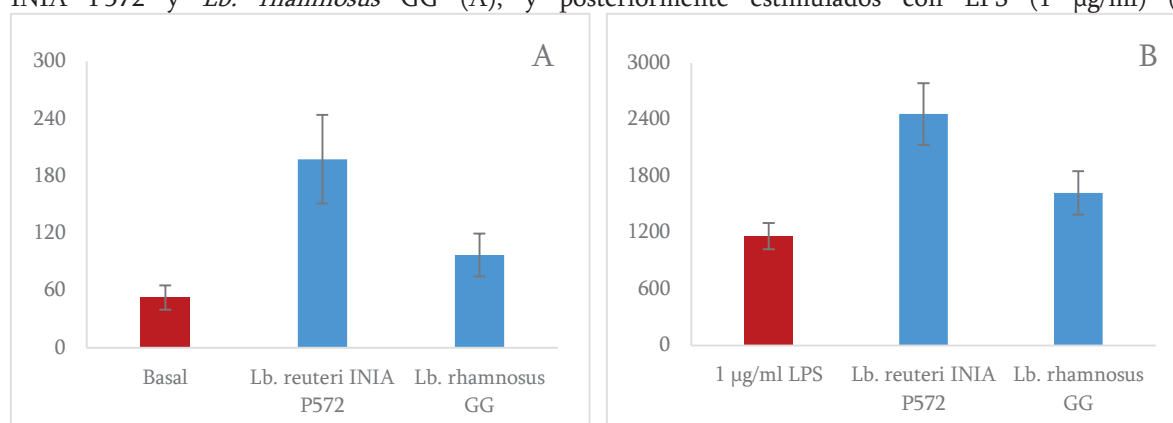
En condiciones basales los macrófagos producen niveles bajos de TNF- $\alpha$ , mientras en presencia de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* den lugar a niveles 24 y 17 veces superiores, respectivamente (Fig. 31, A). Al añadir LPS (1  $\mu$ g/ml) la producción de TNF- $\alpha$  se vio aumentada ligeramente para los ensayos con las dos cepas en comparación con los niveles obtenidos con la estimulación LPS en ausencia de bacterias probióticas (Fig. 31, B).

### IL-1 $\beta$

El efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* sobre la producción de IL-1 $\beta$  (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 posteriormente estimulados o no con LPS (1  $\mu$ g/ml) se muestran en la Fig. 32.

En presencia de *Lb. reuteri* INIA P572, los macrófagos produjeron casi 4 veces más cantidad de IL-1 $\beta$  respecto a los niveles basales, mientras que en presencia de *Lb. rhamnosus* GG la cantidad producida fue aproximadamente del doble de la basal. La estimulación de los macrófagos con LPS (1  $\mu$ g/ml) en presencia de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* dieron lugar a niveles de IL-1 $\beta$  de aproximadamente un 110% y un 35% superiores respecto del control con LPS, respectivamente.

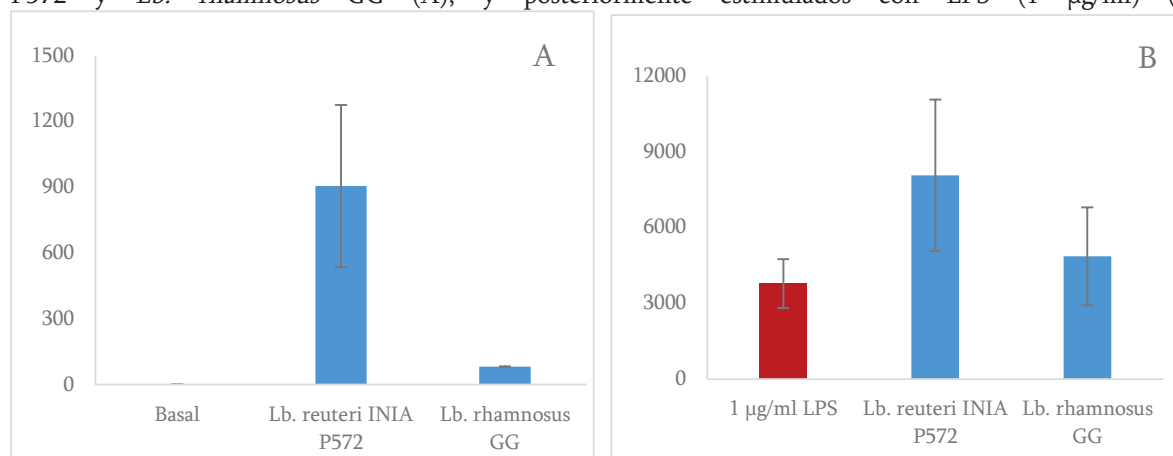
**Figura 32.** Producción de IL-1 $\beta$  (pg/ml) (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG (A), y posteriormente estimulados con LPS (1  $\mu$ g/ml) (B)



### IL-6

El efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* sobre la producción de IL-6 (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 posteriormente estimulados o no con LPS (1  $\mu$ g/ml) se muestran en la Fig. 33.

**Figura 33.** Producción de IL-6 (pg/ml) en macrófagos RAW 264.7 (basal), incubados con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG (A), y posteriormente estimulados con LPS (1  $\mu$ g/ml) (B)



No se observó producción de IL-6 en los macrófagos no estimulados, mientras que durante la incubación con *Lb. reuteri* INIA P572 y *Lb. rhamnosus* GG se produjeron 905 y 82 pg/ml, respectivamente. La producción de esta citoquina al estimular con LPS (1  $\mu$ g/ml) en presencia de *Lb. rhamnosus* GG fue ligeramente superior a la producida por los macrófagos únicamente en presencia de LPS (1  $\mu$ g/ml). Sin embargo, la presencia de *Lb.*

*reuteri* INIA P572 mostró unos niveles de IL-6 de más del doble respecto al control LPS sin probiótico.

Uno de los modelos más estudiados para el estudio de la capacidad inmunomoduladora de algunos microorganismos potencialmente probióticos es la producción de citoquinas por la línea celular de macrófagos RAW 264.7 (Chon y col., 2009; Moro y col., 2012; Rodes y col., 2013; Garrido-Mesa y col., 2015). Estos estudios resultan interesantes antes de realizar un estudio *in vivo* con el fin de evaluar la posible capacidad inmunoestimuladora de las cepas. Sin embargo, son escasos los estudios en que se han realizado pruebas *in vivo* e *in vitro* para una misma cepa de probióticos, y en varios de ellos se habla de la discordancia encontrada entre los dos tipos de ensayos (O'Mahony y col., 2006; Foligne y col., 2007). Una de las posibles razones sería el hecho de que en los ensayos *in vitro* se obvia la presencia del resto de la microbiota y de la función barrera de la mucosa intestinal, lo cual se aleja bastante de una situación real (Rodes y col., 2013).

Las citoquinas son un grupo de proteínas mediadoras que se producen al desencadenarse una respuesta inmunitaria (Abbas y col., 1994). Una vez sintetizadas, se secretan en caso de necesidad, jugando un papel clave en la inmunidad del huésped. Hay un número elevado de publicaciones que afirman que muchas BAL tienen capacidad inmunomoduladora, activando los macrófagos, produciendo citoquinas o potenciando la estimulación del sistema inmunitario asociado a la mucosa del intestino (Sheil y col. 2007; Jones y Versalovic, 2009; Garrido-Mesa y col., 2015; Rong y col., 2015). El potencial de activación de los macrófagos y la consecuente producción de citoquinas es muy importante, ya que estos constituyen el segundo mayor grupo celular dentro del sistema inmunitario. Los macrófagos pueden ser activados por una amplia variedad de estímulos, como la exposición a TLR o a LPS, y sus principales funciones incluyen la fagocitosis de partículas ajenas, la producción de citoquinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, y de especies reactivas de oxígeno, como el NO (Okada y col., 2009; Rodes y col., 2013).

El comportamiento inmunomodulador de las cepas de *Lactobacillus* es totalmente dependiente de cepa (Marcinkiewicz y col., 2007). La producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos

puede verse estimulada por la exposición a BAL como *Lb. helveticus*, *Lb. reuteri* o *Lb. casei shirota* (Cross y col., 2004; Marcinkiewicz y col., 2007; Rong y col., 2015) como se ha visto en los resultados de nuestros experimentos. No obstante, la producción de TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  e IL-6 al estimular líneas celulares con LPS suele resultar muy superior respecto de la producida en presencia de bacterias probióticas de manera individual. La diferencia en la producción de citoquinas al estimular los macrófagos con LPS (1  $\mu$ g/ml) en presencia de bacterias probióticas suele ser menos marcada, aumentando ligeramente respecto a los valores obtenidos al estimular únicamente con LPS (Matsumoto y col., 2005; Okada y col., 2009; Rong y col., 2015). Según lo observado por Wells y col. (2011) en sus experimentos *in vivo*, el género *Lactobacillus* ha sido ampliamente utilizado de manera exitosa para modular enfermedades inflamatorias, potenciar las funciones de la barrera citoplasmática y estimular el sistema inmunitario. La habilidad de *Lb. reuteri* de regular la producción de TNF- $\alpha$  resultó también ser específica de cepa (Jones y Versalovic, 2009). En el caso de *Lb. rhamnosus* GG, sus reconocidos efectos beneficiosos sobre la salud están asociados en parte a la supresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  (Peña y Versalovic, 2003). Sin embargo, en varios estudios *in vitro* realizados con microorganismos potencialmente probióticos y macrófagos RAW 264.7 suele haber una estimulación en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 (Marín y col., 1997, 1998; Okada y col., 2009), aunque el mecanismo por el cual sucede esto es todavía desconocido, la extrapolación de estos resultados a una situación fisiológica real son complicados, como hemos comentado anteriormente. En un estudio de la producción de IL-1 $\beta$  en un modelo de macrófagos RAW 264.7 en presencia de *Bifidobacterium* (Okada y col., 2009) y *Lb. reuteri* (Rodes y col., 2013) se observó, al igual que en nuestros ensayos, un aumento en la producción de IL-1 $\beta$ . Tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  son producidas de forma local por los macrófagos durante las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (Murch y col., 1993).

La IL-6 se ha descrito como una de las citoquinas más secretadas por las células de la lámina propia en pacientes de Chron (Gross y col., 1992), asimismo se ha observado un papel clave para esta citoquina en el desarrollo de la colitis crónica (Yamamoto y col., 2000). Diversos estudios han descrito la capacidad de los algunos *Lactobacillus*

(Christensen y col., 2002), y más concretamente de *Lb.reuteri* (Fukushima y col., 1998), para inducir la producción de IL-6, basandose en el hecho de que las BAL pueden modular la expresión de esta citoquina y potenciar la secreción de IgA. En nuestro estudio, al igual que lo descrito en la bibliografía para otras BAL (Marín y col., 1997, 1998; Matsumoto y col., 2005; Marcinkiewicz y col., 2007), la presencia de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* GG incrementó la producción de IL-6 por los macrófagos RAW 264.7, tanto en ausencia como en presencia de LPS. La estimulación de la secreción de citoquinas observada para *Lb. reuteri* INIA P572 en nuestros ensayos *in vitro*, ha sido incluso más evidente que para *Lb. rhamnosus* GG, cepa de referencia ampliamente empleada tanto en estudios de investigación como a nivel comercial. Según la bibliografía consultada, es más común el uso de microorganismos inactivados por calor (Marín y col., 1997, 1998; Matsumoto y col., 2005) o por irradiación (Marcinkiewicz y col., 2007) que el empleo de células vivas, con el fin de evitar una excesiva proliferación las bacterias en el cultivo celular. Sin embargo, según Marín y col. (1998) los microorganismos inactivados por calor tendrían propiedades inmunomoduladoras menores que las células vivas. En nuestros experimentos se han utilizado células vivas junto con gentamicina para evitar este crecimiento indiscriminado de los microorganismos en el cultivo de macrófagos.

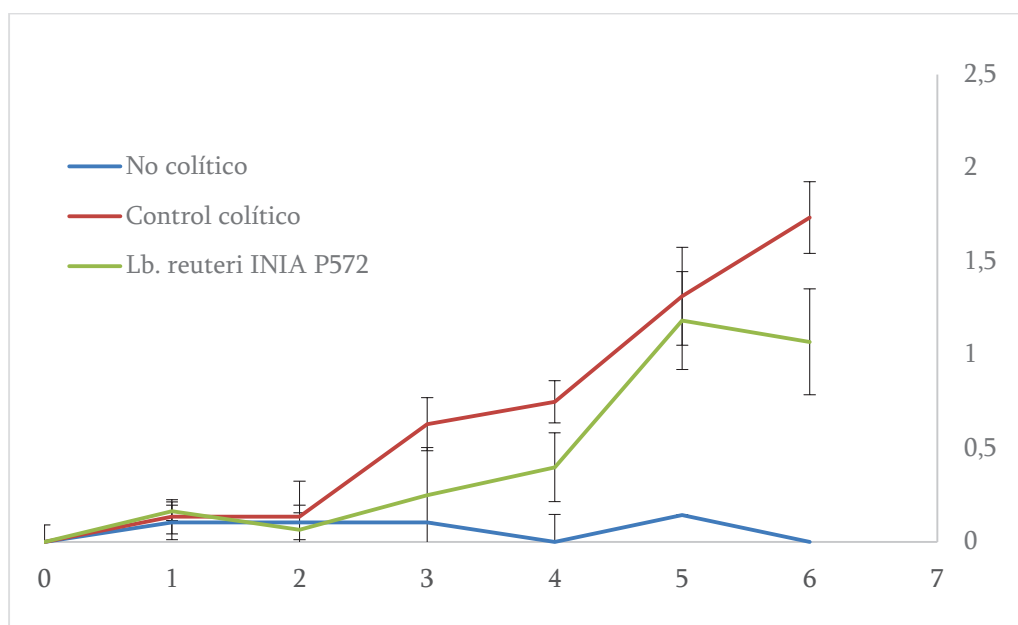
#### 3.8.4. Valoración del efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo *in vivo* de colitis experimental

##### 3.8.4.1. DAI

El índice DAI (del inglés disease activity index) es un parámetro empleado para valorar la inflamación intestinal en modelos de colitis ulcerosa en murinos (Camuesco y col., 2004; Garrido-Mesa y col., 2011a,b; Garrido-Mesa y col., 2015). La administración a ratones de DSS al 3% (p/v) disuelto en el agua de bebida durante 5 días da lugar a un aumento progresivo de los valores DAI debido a la pérdida de peso, la aparición de diarreas y/o sangrado rectal. Este modelo de colitis produce una inflamación limitada a la mucosa colónica que está más relacionada con una colitis ulcerosa (Camuesco y col., 2004). La

Figura 34 muestra la tendencia del valor DAI a lo largo del tiempo en los tres grupos de ratones estudiados. No se observó un aumento considerable de este parámetro en los ratones control sin colitis. Estos valores DAI fueron inferiores durante todo el estudio en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572 respecto a los de los ratones con colitis inducida y sin intervención con el microorganismo probiótico. Además el día 6 se observó una mayor recuperación a la colitis en los ratones a los que se administró *Lb. reuteri* INIA P572 con valores DAI 0,7 unidades inferiores respecto al grupo control colítico. Es decir, la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia de sangre en las mismas fue menos significativa en los ratones a los que se suministró el probiótico una semana antes y durante el tratamiento con DSS.

**Figura 34.** Gráfico del DAI durante los 6 días anteriores al sacrificio de los ratones no colíticos, control colíticos y tratados con *Lb. reuteri* INIA P572 a los que se les indujo colitis



En un estudio de inducción de colitis inducida por DSS realizado con minociclina, antibiótico con poder antiapoptótico, inmunosupresor y antimicrobiano empleado en EII, junto con el probiótico *E. coli* Nissle 1917 se observó, al igual que en nuestro ensayo, una disminución del DAI en los modelos murinos (Garrido-Mesa y col. 2011b). Al suministrar *Saccharomyces boulardii* junto con doxiciclina, antibiótico similar a la minociclina, en ratones a los que se indujo colitis mediante DSS también se observó un descenso en el DAI

(Garrido-Mesa y col., 2015). La evolución del parámetro DAI nos permite evaluar la capacidad de los tratamientos aplicados para reducir la inflamación y mantener la homeostasis intestinal. Estos resultados demuestran que la administración de *Lb. reuteri* INIA P572 ejerce un efecto beneficioso sobre los efectos adversos producidos por la colitis inducida mediante DSS.

#### 3.8.4.2. Expresión génica de marcadores moleculares en tejido colónico

Se estudiaron seis marcadores relacionados con la respuesta inmunitaria mediante PCR a tiempo real. En la Fig. 35 se muestran los resultados expresados como porcentajes de aumento o disminución de la expresión de los genes estudiados. TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, ICAM-1 y MCP-1 mostraron niveles de expresión significativamente ( $P < 0,05$ ) inferiores en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572 respecto a los ratones control colíticos. La expresión de IL-1 $\beta$  fue ligeramente menor en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572, sin diferir significativamente de los ratones colíticos control.

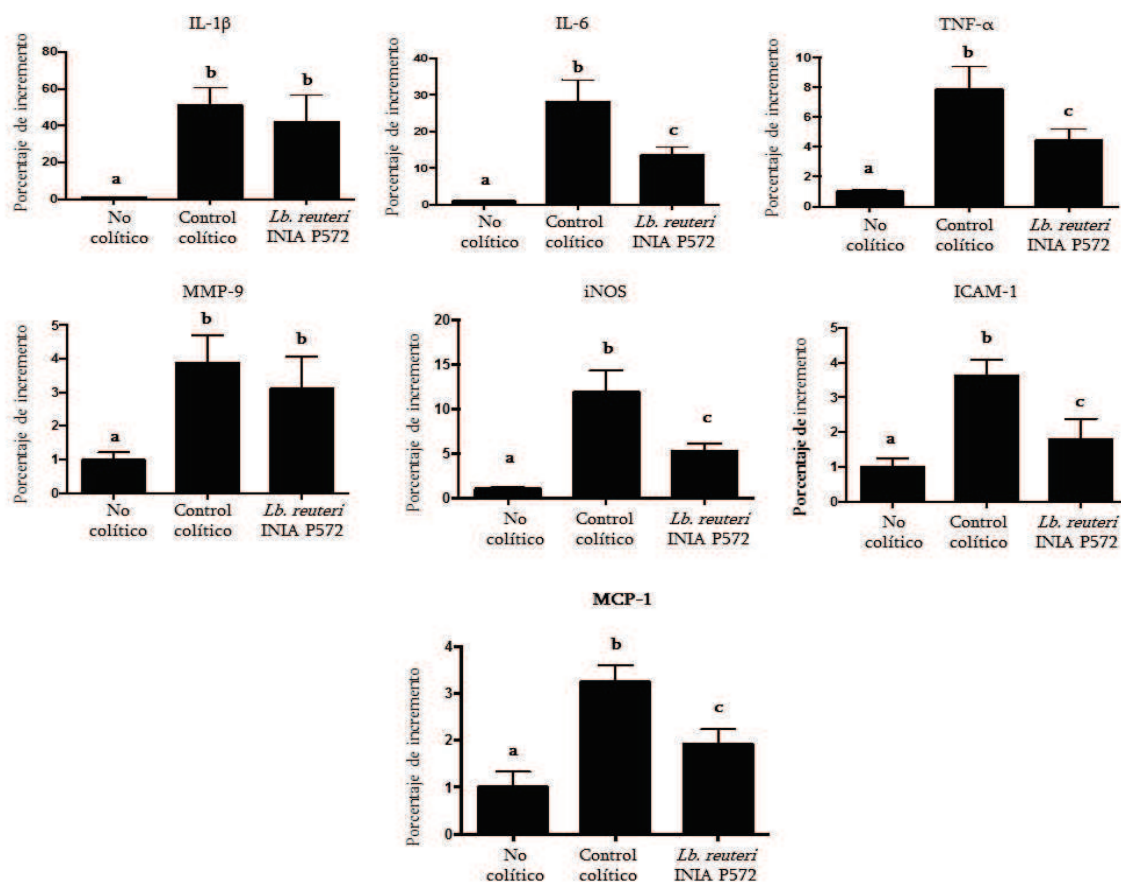
En el estudio de la inflamación intestinal en modelos murinos de colitis inducida por DSS, suele aumentar la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en los murinos colíticos control (Ghia y col., 2006; Shifrin y col., 2013). Al igual que en nuestro estudio, reducciones significativas ( $P < 0,05$ ) de estas dos citoquinas fueron observadas por Peran y col. (2007) tras suministrar *Lb. reuteri* ATCC55730 en un modelo de colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en ratas. Otros probióticos como *Lb. casei* shirota fueron capaces de inhibir la producción de citoquinas como IL-6 en células de la lámina propia del intestino grueso (Matsumoto y col., 2005).

La enzima MMP-9 pertenece al grupo de las proteasas y su expresión se encuentra altamente incrementada en el intestino inflamado (Baugh y col., 1999). Los niveles del enzima MMP-9 fueron inferiores en los ratones tratados con el probiótico en comparación con el ratón control con colitis, aunque no hubo diferencias significativas. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) al estudiar la expresión del enzima iNOS y la proteína proinflamatoria ICAM-1 en comparación con los valores observados en los ratones colíticos control. La ICAM-1 es una glicoproteína de adhesión intercelular que

aumenta la infiltración de las células en el tejido colónico, aumentando así la inflamación (Garrido-Mesa, 2011). La inhibición de ICAM-1 por parte del probiótico *Lb. casei* inmunitas en un modelo de colitis experimental por TNBS en ratas fue también descrito por Angulo y col. (2006). Un descenso en la expresión del enzima iNOS también fue observado en un estudio en ratas tratadas con *Lb. reuteri* ATCC55730 y sometidas a colitis inducida por TNBS (Peran y col., 2007). Algunos estudios han descrito la capacidad de algunos probióticos para reducir los niveles de TNF- $\alpha$  y de iNOS, ya que existe un vínculo directo entre el desarrollo del estrés oxidativo, fenómeno relacionado con la inflamación, y la regulación de la expresión de iNOS. Por tanto, la citoquina TNF- $\alpha$  promueve la expresión de iNOS (Hecker y col., 1996; Seril y col., 2003). De este modo, la reducción en la expresión de TNF- $\alpha$  provocada por el tratamiento con *Lb. reuteri* INIA P572 también disminuyó la expresión de iNOS, que juega un papel importante en las EII (Fiocchi, 1998). La quimiocina MCP-1 juega un papel importante en el reclutamiento de monocitos y macrófagos desde el torrente sanguíneo a los tejidos inflamados (Takada y col., 2010). La expresión del mRNA de la MCP-1 se vio reducida significativamente ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572 respecto del control colítico. Nuestros resultados indican que la administración de *Lb. reuteri* INIA P572 a ratones en el modelo de colitis ulcerosa inducida mediante DSS daría lugar a un efecto inmunomodulador beneficioso frente a esta patología.



**Figura 35.** Efecto del tratamiento con *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo murino de colitis inducida por DSS en la expresión del ARNm de los marcadores de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-9, iNOS, ICAM-1, MCP-1, cuantificados mediante PCR a tiempo real.



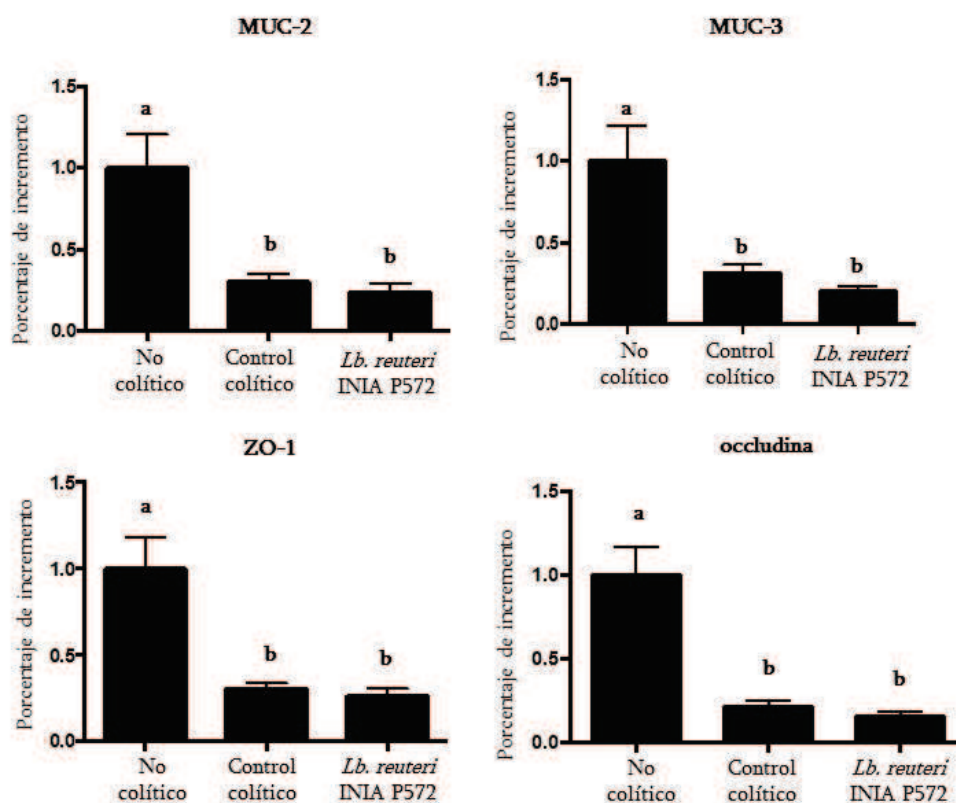
<sup>a-c</sup>. Las diferentes minúsculas muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la expresión de genes entre los distintos tratamientos de los ratones

De la misma forma se estudiaron en los modelos de colitis experimental los marcadores MUC-2, MUC-3, ZO-1 y occludina, los cuales están relacionados con la permeabilidad intestinal (ver Figura 36). Aunque estas proteínas tienen un papel importante en la función de barrera intestinal, no se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en su expresión por el tratamiento con *Lb. reuteri* INIA P572 respecto al control colítico.

Las EII están relacionadas con un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, ICAM-1 e iNOS, siendo todos ellos piezas fundamentales en la patogénesis de las EII (Sartor, 2004; Abraham y Judy, 2009). El descenso de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  puede estar relacionado también con la regulación de la expresión de quimiocinas como la MCP-1, así como de la molécula de adhesión

intracelular ICAM-1, que causaría una reducción de la infiltración celular en el tejido colónico y como consecuencia una disminución de la expresión de la enzima iNOS, que es principalmente sintetizada por células inflamatorias (Camuesco y col., 2004). De este modo, el descenso observado en la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, ICAM-1 y MCP-1 en los ratones tratados con *Lb. reuteri* INIA P572 dan lugar a un efecto beneficioso debido a una mejora de la respuesta del sistema inmunitario en estado alterado, ayudando a disminuir el proceso inflamatorio y a mantener la función barrera, y por tanto la homeostasis intestinal.

**Figura 36.** Efecto del tratamiento con *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo murino de colitis inducida por DSS en la expresión del ARNm de los marcadores de MUC-2, MUC-3, ZO-1, occludina cuantificados mediante PCR a tiempo real



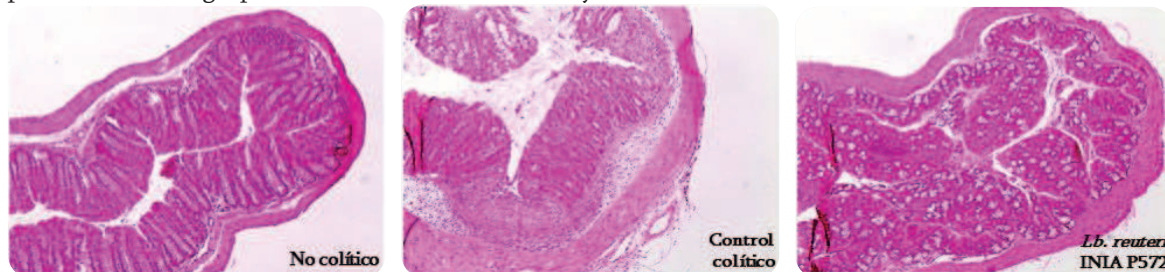
<sup>a-c</sup>. Las diferentes minúsculas muestran diferencias significativas en la expresión de genes entre los distintos tratamientos de los ratones

### 3.8.4.3. Estudios histológicos

Se llevó a cabo el estudio microscópico de las muestras procedentes del tejido colónico, correspondientes a los distintos grupos experimentales: no colítico, control colítico y colítico tratado con *Lb. reuteri* INIA P572. En la Figura 37 se indican fotografías

representativas de los cortes histológicos del colon teñidos con hematoxilina y eosina.

**Figura 37.** Cortes histológicos de segmentos de colon teñidos con hematoxilina/eosina de los ratones pertenecientes al grupo no colítico, control colítico y colítico tratado con *Lb. reuteri* INIA P572



El estudio histológico reveló que, en el grupo control colítico, el proceso inflamatorio intestinal se asoció con un daño severo en la mucosa colónica caracterizado por la ulceración del tejido, que afecta a una parte importante de la superficie (aproximadamente del 50%), junto con la disminución del número de células caliciformes, muchas de ellas vacías de su contenido mucoso. Además, el daño tisular también se evidenció por el elevado grado de infiltración celular en algunas zonas de la lámina propia, preferentemente de neutrófilos. Las muestras procedentes de ratones sometidos a tratamiento con el probiótico presentan un daño significativamente menor que el observado en los ratones colíticos del grupo control. En este sentido, existe un menor grado de ulceración del epitelio de la mucosa, de forma que ésta afecta a menos del 25% de la superficie de la mucosa. Asimismo, el número de células caliciformes es mayor, encontrándose mayoritariamente repletas de su contenido mucoso. Por último, el proceso inflamatorio en este grupo puede considerarse de menor severidad por la reducción en la infiltración celular en la lámina propia del tejido colónico. En consecuencia, aunque los ratones tratados con el probiótico *Lb. reuteri* INIA P572 presentan signos de daño tisular colónico en comparación con el grupo no colítico, éste es significativamente inferior al obtenido en los animales colíticos del grupo control que no recibieron tratamiento probiótico. Todos estos datos confirman el efecto beneficioso ejercido por el probiótico en el modelo de colitis experimental inducida por DSS, tal y como se ha puesto de manifiesto con la mejora de los datos macroscópicos y bioquímicos detallados en el apartado anterior.

El análisis de todos estos parámetros obtenidos tras la evaluación macroscópica, microscópica y bioquímica son comúnmente utilizados para valorar la eficacia de potenciales tratamientos en la enfermedad inflamatoria intestinal, tal y como se ha puesto previamente de manifiesto tras la administración de probióticos en otros modelos de colitis experimental en ratas o ratones (Garrido-Mesa y col., 2011b, 2015, Rodríguez-Nogales y col., 2015). Se han descrito la capacidad de otras cepas de *Lb. reuteri* y *Lb. fermentum* para promover la recuperación histológica intestinal en un modelo de colitis experimental inducida por TNBS en ratas, de una forma similar a los descritos en nuestro experimento (Mao y col., 1996; Madsen y col., 1999; Peran y col., 2007). Otros estudios en los que se combinaban los probióticos *E. coli* Nissle 1917 o *S. boulardii* junto con antibióticos como minociclina y doxicilina, empleando este modelo de colitis inducida mediante DSS, también revelaron una mayor recuperación histológica del tejido colónico (Garrido-Mesa y col., 2011b, 2015). Todos estos estudios respaldan el hecho de que la intervención con microorganismos probióticos puede ser beneficiosa en el tratamiento de las EII.



CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES

---



## Conclusions:

1. *In situ* reuterin production was demonstrated by the addition of *Lb. reuteri* INIA P572 and glycerol in cheese and yogurt.
2. Reuterin and diacetyl in combination exhibited a synergistic antimicrobial effect in milk against *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 while antimicrobial activity was not increased against *Listeria monocytogenes* in comparison with individual treatments.
3. Hep G2 cell assays results indicate that after a single exposure, acrolein would be considered as a high toxic compound, while reuterin and diacetyl presented a moderate and low toxicity profile, respectively.
4. High hydrostatic pressure treatments combined with reuterin in cold smoked salmon avoided the recovery of *L. monocytogenes* registered with individual treatments during 35 days of refrigeration at 4 °C. The pressurization inhibited the growth of *S. Enteritidis* and the combination of high hydrostatic pressure with reuterin or lactoperoxydase system increased the antimicrobial effect in *E. coli* O157:H7. The combination of high hydrostatic pressure with reuterin delayed the spoilage of cold smoked salmon and prevented the biogenic amines formation. This combined treatment slightly increased the lightness of the product.
5. The combination of high hydrostatic pressure with reuterin or lactoperoxydase system in cooked ham showed a synergistic antimicrobial activity which prevented the recovery of *L. monocytogenes* at 4 °C. *S. Enteritidis* and *E. coli* O157:H7 restart their growth in pressurized cooked ham refrigerated at 10 °C, while with combined treatments pathogens were not detected during 35 days. Reuterin and lactoperoxydase system applied individually or combined with high



- hydrostatic pressure reduced total viable counts and slightly affected texture and colour.
6. The *Lb. reuteri* INIA P572 addition as a bioprotective culture with glycerol in the manufacture of cheese showed a maximum reuterin production of approximately 5  $\mu\text{mol/g}$  in cheese, inactivating *L. monocytogenes* from the first week and *E. coli* O157:H7 from the first day after cheese manufacture.
  7. The use of *Lb. reuteri* INIA P572 as a bioprotective culture adjunct plus glycerol in the manufacture of cheese diminished total viable counts levels, whereas a decrease in proteolysis of cheese and the presence of some volatile compounds related with reuterin were registered.
  8. *Lb. reuteri* INIA P572 survived to *in vitro* gastrointestinal conditions assayed and was able to produce reuterin in a colon model system not affecting the main microbial population in the human gut microbiota.
  9. *Lb. reuteri* INIA P572 showed a macrophage-stimulating activity (production of nitric oxide,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ) in RAW 264.7 cell line. However, no immunomodulatory effect was registered by *Lb. reuteri* after cell stimulation with lipopolysaccharide.
  10. The protective effect of *Lb. reuteri* INIA P572 was confirmed in a murine *in vivo* model of experimental colitis, where the probiotic administration reduced the expression of certain inflammatory markers ( $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , iNOS, ICAM-1 y MCP-1), improved DAI index and decrease the colonic tissue damage.

## Conclusiones:

1. Se ha demostrado la producción *in situ* de reuterina en queso y yogur mediante la adición de *Lactobacillus reuteri* INIA P572 y glicerol.
2. La combinación de reuterina y diacetilo mostró un efecto antimicrobiano sinérgico en leche frente a *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* O157:H7 mientras que frente a *Listeria monocytogenes* no se observó incremento de la actividad antimicrobiana respecto a los tratamientos individuales.
3. En ensayos con células Hep G2 la reuterina y el diacetilo mostraron un perfil de toxicidad moderado y bajo respectivamente, mientras que la acroleína presentó un perfil de toxicidad alto.
4. La combinación de tratamientos de alta presión con reuterina en salmón ahumado evitó la recuperación de *L. monocytogenes* registrada con los tratamientos individuales durante 35 días de refrigeración a 4 °C. La presurización inactivó completamente a *S. Enteritidis* y la combinación de la presurización con reuterina o el sistema lactoperoxidasa incrementó la inactivación de *E. coli* O157:H7. La alta presión en combinación con reuterina retrasó la alteración microbiológica del salmón ahumado y evitó la formación de aminos biógenas. El tratamiento produjo un ligero empalidecimiento del producto.
5. La combinación de alta presión con reuterina o el sistema lactoperoxidasa en jamón cocido mostró un efecto antimicrobiano sinérgico que evitó la recuperación de *L. monocytogenes* a 4 °C. *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 se recuperaron en jamón cocido presurizado refrigerado a 10 °C, mientras que con los tratamientos combinados no se detectaron durante 35 días. La reuterina y el sistema lactoperoxidasa aplicados individualmente o en combinación con altas presiones

- inactivaron a los microorganismos totales y afectaron ligeramente al color y la textura.
6. La adición de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo bioprotector junto con glicerol dio lugar a una producción máxima de reuterina de aproximadamente 5  $\mu\text{mol/g}$  en queso, consiguiendo la inactivación de *L. monocytogenes* desde la primera semana de maduración y de *E. coli* O157:H7 desde el primer día después de la fabricación.
  7. El empleo de *Lb. reuteri* INIA P572 como cultivo bioprotector junto con glicerol en la elaboración de queso disminuyó los niveles de los microorganismos totales, observándose una menor proteólisis en el queso y la presencia de varios compuestos volátiles relacionados con la reuterina.
  8. *Lb. reuteri* INIA P572 sobrevivió a las condiciones gastrointestinales ensayadas *in vitro* y fue capaz de producir reuterina en un modelo de colon sin afectar a las poblaciones microbianas mayoritarias de la microbiota fecal humana.
  9. *Lb. reuteri* INIA P572 mostró capacidad para estimular la producción de óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Sin embargo, no se observó un efecto inmunomodulador del probiótico tras estimular las células con lipopolisacáridos.
  10. Se comprobó el efecto protector de la administración de *Lb. reuteri* INIA P572 en un modelo murino *in vivo* de colitis experimental por sulfato de dextrano sódico, que disminuyó los niveles de expresión de determinados marcadores de inflamación (IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, ICAM-1 y MCP-1), mejoró el índice DAI y redujo el daño del tejido colónico.



## BIBLIOGRAFÍA





- Aagard, K. M. J., Anthony, K. M., Ganu, R., Petrosino J., Versalovic, J. (2014).** The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6, 237-265.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (1994).** Cellular and molecular immunology, 2<sup>nd</sup> ed. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Abeles, R. H., Brownstein, A. M., Randles, C. H. (1960).**  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 41, 530-531.
- Abraham, C., Judy, H. C. (2009).** Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361, 2066-2078.
- Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Appel, K. E., Lampen, A. (2011).** Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1277-1290.
- Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M., Michiels, C.W. (2005).** Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2226-2231.
- Al-Nabulsi, A. A., Holley, R. A. (2007).** Effects on *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 84-91.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. (1999).** Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 33-42.
- Álvarez-Olmos, M. I., Oberhelman, R. A. (2001).** Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Disease*, 20, 1567-1576.
- Alzamora, S. M., Tapia, M. S., Welti-Chanes, J. (1998).** New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation. *Food science and technology international*, 4, 353-361.
- Amanatidou, A., Schlüter, O., Lemkau, K., Gorris, L. G. M., Smid, E. J., Knorr, D. (2000).** Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 87-98.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J. R. y Martínez-Hernández, D. (2004).** Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, Junio 17, 131-139.
- Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A. V., Del Nobile, M. A. (2014).** Biopreservation of Fiore di Latte Cheese. *Journal of Dairy Science*, 97, 5345-5355.

- Angsupanich, K., Ledward, D. A. (1998).** High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. Food Chemistry, 63, 39–50.
- Angulo, S., Llopis, M., Antolin, M., Gironella, M., Sans, M., Malagelada, J. R. y col. (2006).** *Lactobacillus casei* prevents the upregulation of ICAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental colitis. American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology, 291, 1155–1162.
- Arneth, W. (1998).** The chemical bases of reddening. Fleischwirtschaft, 78, 868.
- Arqués, J. L. (2003).** Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM.
- Arqués, J. L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., Medina, M. (2004).** Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 95, 225–229.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2008a).** Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. Journal of Dairy Science, 91, 70–75.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2008b).** Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. European Food Research and Technology, 227, 77–82.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2011).** Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. Food Control, 22, 457–461.
- Arribas, B., Suárez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J. M., Buttersack, Rodríguez-Cabezas, M. E. y col (2010).** Di-d-fructose dianhydride-enriched caramels: effect on colon microbiota, inflammation, and tissue damage in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 58, 6476–84.
- Aureli, P., Capruso, L., Castellai, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli y col. (2011).** Probiotics and health: An evidence-based review. Pharmacological research, 63, 366–376.
- Axelsson, T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. (1989).** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2, 131–136.



- Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, M. (2005).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68, 173-177.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M. (2008).** Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114-129.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005).** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915-1920.
- Baker, E. N. (1994).** Structure and reactivity of transferrins. In: Sykes, A.G. (Ed) *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 41. Academic Press, Inc., San Diego, California, 389-463.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. H., Palou, E. Swanson, B. G. E. (1998).** Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker, Inc, New York, EE.UU.
- Barbirato, F., Camarasca-Claret, C, Bories, A., Grivet, J-P. (1995).** Description of the glycerol fermentation by a new 1,3- propanediol producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 786-793.
- Bauer, R., du Toit, M., Kossmann, J. (2010).** Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 28-31.
- Baugh, M. D., Perry, M. J., Hollander, A. P., Davies, D. R., Cross, S. S., Lobo, A. L. y col. (1999).** Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 117, 814-822.
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V., Allaker, R. P. (2002).** Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109, 527-533.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., Mackey, B. (1999).** Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1564-1569.
- Benkerroum, N., Sandine, W. E. (1988).** Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 71, 3237-3245.
- Biebl, H., Marten, S., Hippe, H., Deckwer, W-D. (1992).** Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology Biotechnology*, 36, 592-597.

- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., Deckwer, W. D. (1999)** Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 52, 289–297.
- Blanco, J. (1993).** *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo, 1-361.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., González, E. A. y col. (2004).** Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 645-651.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L., Blixt, Y. (1996).** Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103–120.
- Bravo, D., de Alba, M., Medina, M. (2014).** Combined treatments of high-pressure with the lactoperoxidase system or lactoferrin on the inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carpaccio. *Food Microbiology*, 41, 27-32.
- Butz, P., Tauscher, B. (2002).** Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35, 279-284.
- Cabeza, M. C., Cambero, I., De la Hoz, L., Ordóñez, J. A. (2007).** Optimización of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 299-305.
- Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P., Nuñez, M. (2013a).** High-pressure processing decelerates lipolysis and formation of volatile compounds in ovine milk blue-veined cheese. *Journal of Dairy Science*, 96, 7500-7510.
- Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P., Nuñez, M. (2013b).** High-pressure processing for the control of lipolysis, volatile compounds and off-odours in raw milk cheese. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1404- 1413.
- Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P., Nuñez, M. (2015).** Effect of High-Pressure-Processing on the Lipolysis, Volatile Compounds, Odour and Colour of Cheese Made from Unpasteurized Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1076-1088.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., Lorente, M. D., Concha, A. y col. (2004).** The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, 143, 908-918.

- Cantoni, C., Moret, S., Comi, G. (1993). Bacteriological and chemical indexes to evaluate smoked salmon quality. *Industrie Alimentari*, 32, 842–845.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, T., Cheftel, J. C. (1995). Changes in color and myoglobin of minced beef meat due to high-pressure processing. *Food Science and Technology*, 528–538.
- Casas I. A., Dobrogosz, W. J. (1997). *Lactobacillus reuteri*: an overview of a new probiotic for humans and animals. *Microecology and Therapy*, 26, 221–231.
- Casas I. A., Dobrogosz, W. J. (2000). Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 247–285.
- Chen, C. N., Sung, H. W., Liang, H. F., Chang, W. C. (2002). Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61, 360–369.
- Chéret, R., Chapleau, N., Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., de Lamballerie, M. (2005). Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. *Journal of Food Science*, 70, 477–483.
- Chon, H., Chon, B., Choi, Lee, E., Lee S., Jeong, G. (2009). Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1588–1597.
- Christensen, H. R., Frøkiaer, H., Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *Journal of Immunology*, 168, 171–178.
- Chung, T. C., Axelsson, L. T., Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1989). *In vitro* studies of reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health Disease*, 2, 137–144.
- Chung, H. J., Lee, N. Y., Jo, C., Shin, D. H. Byun, M. W. (2007). Use of gamma irradiation for inactivation of pathogens inoculated into Kimbab, steamed rice rolled by dried laver. *Food Control*, 18, 108–112.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219–1227.
- Giorba, M. A. (2012). A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10, 960–968.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Hérranz, C., Nes, I. F., Hernández P. E. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7, 281–305.

- Circle, S. J., Stone, L., Boruff, C. S. (1945). Acrolein determination by means of tryptophane. Industrial and Engineering Chemistry, 17, 259-262.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, W. L., Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell, 148, 1258-1270.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. BMC Microbiology, 7, 101.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Laboratory Investigation. 69, 238-249.
- Cross, M. L., Ganner, A., Teilab, D., Fray, L. M. (2004). Patterns of cytokine induction by Gram-positive and Gram-negative probiotic bacteria. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 42, 173-80.
- Curioni, P. M. G., Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. International Dairy Journal, 12, 959-984.
- D'Aoust, J. Y. (2000). *Salmonella*. En: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W., Eds. The Microbiological Safety and Quality of Foods, 1233-1299. Aspen, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.
- Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G. (1992). Parameters effecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. Applied Environmental Microbiology, 58, 1233-1239.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, Des, Cotter, P. D., Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocina producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cheese. International Journal of Food Microbiology, 153, 58-65.
- Daniel, R., Bobik, T. A. Gottschalk, G. (1998). Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. FEMS Microbiol Reviews, 22, 553-566.
- Dayeh, V. R., Schirmer, K., Lee, L. E. J, Bols, N. C. (2005). Rainbow trout gill cell line microplate cytotoxicity test. In small-scale freshwater toxicity investigations, Vol. 1. Edited by Blaise, C., Férard, J. F. Springer; 473-503.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. (2012a). High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the characteristics of beef carpaccio Meat Science, 92, 823-828.
- De Alba, M., Montiel, R. Bravo, D., Gaya, P., Medina, M. (2012b). High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. Meat Science, 91, 173-178.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. (2013). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. Food control, 31, 508-513.
- De Alba, M. (2014). Tratamientos combinados de altas presiones y bioconservación en la mejora de la seguridad microbiológica de productos cárnicos listos para el consumo. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM.

- De Alba, M., Bravo, D. A., Medina, M. (2015). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in dry-cured ham combined treatments of high pressure and lactoperoxidase system or lactoferrin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 54-59.
- De Boever, P., Deplancke, B., Verstraete, W. (2000). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*, 130, 2599-2606.
- De Jong, L. (1978). The influence of the moisture content on the consistency of protein breakdown of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32, 1-14.
- De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. (2010). Short communication: Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 93, 3965-3969.
- Del Olmo, A. (2012). Evaluación del efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina y sus derivados, y su combinación con altas presiones, sobre patógenos y alterantes de la carne y productos cárnicos. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. (2012a). Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria *in vitro* and, combined with high pressure, in chicken breast fillets. *Meat Science*, 90, 71-76.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. (2012b). Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 51- 56.
- De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- De Weirtdt, R., Possemiers, S., Vermeulen, G., Moerdijk-Poortvliet, T. C. W., Boschker, T. y col. (2010). Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 601-611
- De Weirtdt, R., Crabbé, A., Roos, S., Vollenweider, S., Lacroix, C., Pijkeren, P. V., y col. (2012). Glycerol supplementation enhances *L. reuteri*'s protective effect against *S. Typhimurium* colonization in a q3-D model of colonic epithelium. *PLoS ONE*, 7, e37116.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 18, 6, e280.
- Desmazeaud, M. J., Gripon, J. C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.

- Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M., Buchin, S., Calasso, M., Fox, P. y col. (2011).** Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*, 21, 254-260.
- Díaz, J. J., González, D. (2015).** Aplicaciones en gastroenterología. *Nutrición Clínica*, 31, 21-25
- Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. (1988).** Antibiotic reuterin. US Patent PCT/US88/01423.
- Doleyres, Y., P. Beck, S. Vollenweider, C. Lacroix. (2005).** Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiolal Biotechnology*, 68, 467-474.
- Donohue, D. C., Salminen, S. (1996).** Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5, 25-28.
- Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. (1997).** *Escherichia coli* O157:H7. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T.J. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 171-191.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.
- DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G. (1971).** Pathogenesis of *Esceherichia coli* diarrhea. *New England Journal of Medicine*, 285, 1-9.
- Durante, R. W. (2002).** Food processors requirements met by radiation processing. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 289-294.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T. (1993).** Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76, 575-577.
- EFSA, (2014).** Scientific report of EFSA and ECDC. *EFSA Journal* 2015, 13, 4329.
- El-Ziney, M. G., Debevere, J. M. (1998).** The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection*, 61, 1275-1280.
- El-Ziney, M. G., van den Tempel, T., Debevere, J., Jakobsen, M. (1999).** Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *Journal of Food Protection*, 62, 257-261.
- Elika (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria), (2013).** Informes de zoonosis.
- Elliot, R. M., McLay, J. C., Kennedy, M. J., Simmonds, R. S. (2004).** Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 73-81
- Erkan, N., Üretener, G., Alpas, H., Selçuk, A., Özden, O., Buzrul, S. (2011).** The effect of different high pressure conditions on the quality and shelf life of cold smoked fish. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 104-110.
- Escalante Lozada, A. (2001).** El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 106-114.



- FAO. (Food and agricultural organization of the United Nations). (1997). Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos.
- FAO/WHO (Food and agricultural organization of the United Nations and World Health organization). (2002) Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación - Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 85.
- FAO/WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods technical report. Microbiological risk assesment series 4.
- Fernández, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marín, M., Jiménez, E., Rodríguez, J. M. (2014). Probiotics for human lactational mastitis. Beneficial Microbes, 5, 169-183.
- Ferrari, M., Fornasiero, M. C., Isetta, A. M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. Journal of Immunological Methods, 131, 165-172.
- Ferrer, M. D., de Simón, M. (2002). Importancia de *E. coli* O157: H7 como patógeno emergente de transmisión alimentaria. XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos de la SEM. Libro de ponencias, comunicaciones y posters, 203-208.
- FDA (Food and Drug Administration). (2011). Fish and fishery products (Hazards and controls guidance). Washington D.C: Center for Food safety and applied nutrition. US Department of Health and Human Service.
- Filocamo, A., Nueno-Palop, C., Bisignano, C., Mandalaria, G., Narbad, A. (2012). Effect of garlic powder on the growth of commensal bacteria from the gastrointestinal tract. Phytomedicine, 19, 707-711.
- Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. Gastroenterology, 115, 185-205.
- Floch, M. H., Walker, W. A., Madsen, K., Sanders, M. E., Macfarlane, G. T., Flint, H. J. (2011). Recommendations for probiotic use-2011 update. Journal of Clinical Gastroenterology, 45, 168-171.
- Flórez, A., Ruas-Madiedo, P., Alonso, L., Mayo, B. (2006). Microbial, chemical and sensorial variables of the Spanish traditional blue-veined Cabrales cheese, as affected by inoculation with commercial *Penicillium roqueforti* spores. European Food Research and Technology, 222, 250-257.
- Foligne, B., Nutten, S. Granette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S. y col. (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World Journal of Gastroenterology, 14, 13, 236-243.
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). (2002). Final assessment report Application A-404: Lactoperoxidase System. <http://www.foodstandards.gov.au/>
- Francavilla, R., Lionetti, E., Casrellaneta, S. P., Maqusta, A. M., Maurogiovanni, G., Bucci, N. y col. (2008). Inhibition of *Helicobacter pylori* infection in humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and effect on eradication therapy: a pilot study. Helicobacter, 13, 127-34.

- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., Mitsuoka, T. (1998).** Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*, 42-39.
- Galazka, V., Ledward, D. (1998).** High pressure effects on biopolymers. In S. E. Hill, D. A. Ledward, & J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 278–301). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.
- Galdeano, C. M., Perdígón, G. (2004).** Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 673–81.
- Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claissé, O., Lonvaud-Funel, A., Irastorza, A. y col. (2008).** Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 253–261.
- García-Graells, C., Valckx, C., Michiels, C.W. (2000).** Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4173–4179.
- García-Graells, C., Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. M. Michiels, C. W. (2003).** The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 211–221.
- Garrido-Mesa, N. (2011).** Minocycline in inflammatory bowel disease: far beyond an antibiotic. Tesis doctoral, Departamento de Farmacología, Universidad de Granada.
- Garrido-Mesa, N., Camuesco, D., Arribas, B., Comalada, M., Bailón, E., Cueto-Sola, M. y col. (2011a).** The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. *Pharmacological Research*, 63, 308–319.
- Garrido-Mesa, N., Utrilla, P., Comalada, M., Zorrilla, P., Garrido-Mesa, J., Zarzuelo, A. y col. (2011b).** The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1891–1900.
- Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodríguez-Noglaes A., Utrilla. P., Rodríguez-Cabezas M. E, Zarzuelo A., y col. (2015).** A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardi*. *Pharmacological Research*, 97, 48–63.
- Garriga, M., Aymerich, T., Costa, S., Monfort, J. M. Hugas, M. (2002).** Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19, 509–518.
- Gasser, F., (1994).** Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin del'Institute Pasteur*, 92, 45–67.



- Gay, M., Amgar, A. (2005). Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait*, 85: 153–170.
- Gerez, C. L., Cuezco, S., Rollán, G., Font de Valdez, G. (2008). *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 as starter culture for wheat dough fermentation. *Food Microbiology*, 25, 253–259.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F., Collins, S. M. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, 131, 1122–1130.
- Gomes, R., Meek, M. E., Eggleton, E. (2002) Concise International Chemical Assessment Document 43: Acrolein, World Health Organization, Geneva 2002.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M., Montero, P. (2007). High pressure on the quality and preservation of cold-smoked dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. *Food Chemistry*, 102, 1250–1259.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*, 42, 82–88.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
- Gross, V., Andus, T., Caesar, I., Roth, M., Schölmerich, J. (1992). Evidence for continuous stimulation of IL-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 102, 514–519.
- Gudbjornsdottir, B., Jonsson, A., Hafsteinsson, H., Heinz, V. (2010). Effect of high pressure processing on *Listeria* spp. and on the textural and microstructural properties of cold smoked salmon. *Food Science and Technology*, 43, 366–374.
- Gupta, K. G., Chandiok, L., Bhatnagar, L. (1973). Antibacterial activity of diacetyl and its influence on the keeping quality of milk. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*, 158, 202–205.
- Hall, R. H., Stern, E. S. (1950). Acid-catalysed hydration of acrylaldehyde: Kinetics of the reaction and isolation of  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde. *Journal of Chemical Society*, 490–498.
- Haller, D., Colbus, M. G., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 218–226.
- Hargrove, R. E., McDonough, F. E., Tittsler, R. D. (1967). Factors affecting characteristics, composition and quality of skim milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 49, 796–799.
- Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P., Busse, R. (1996). Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *British Journal of Pharmacology*, 118, 2178–2184.
- Heisler, M. G., Kraft, A. A., Rey, C. R., Rust, R. E. (1972). Effect of time and temperature of smoking on microorganisms on frankfurters. *Journal of Food Science*, 37, 845–849.

- Hekmat, S., Reid, G. (2007).** Survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in milk. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 615-619.
- Heyndrickx, M., de Vos, P., Vacanneyt, M., de Ley, J. (1991).** The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 637-642.
- Hendrickx, M. E. G., Knorr, D., Loey, A. V., Heinz, V. (2005).** *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. Kluwer Academic Plenum Publishers, 297-309.
- Herrero, A. M. Romero de Avila, M. D. (2006).** Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50, 71-74.
- Hill, C., Guarner, F., Ried, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. y col. (2014).** The International Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of term probiotic. *Nature Reviews, Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506-514.
- Hite, B. H. (1899).** The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull West Virginia University of Agricultural Experiment Station*, 58, 15-35.
- Holm, E. S., Schäfer, A., Skov, T., Koch, A. G., Petersen, M. A. (2012).** Identification of chemical markers for the sensory shelf-life of saveloy. *Meat Science*, 90, 314-322.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. Williams, S. T. (2000).** Group 5. Facultatively anaerobic gramnegative rods. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., 175-290, Lippincott, Williams y Wilkins, Philadelphia.
- Höltzel, A., Gänzle, M. G., Nicholson, G.J., Hammes, W. P., Jung, G. (2000).** The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 2766-2768
- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W-D., Schink, B. (1990).** Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 121-126.
- Horcajo, P., Domínguez-Bernal, G., De la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Blanco, J. E., Blanco, M. y col. (2012).** Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Veterinary Microbiology*, 155, 341-348.
- Hoz, L., López-Gálvez, D. E., Fernández, N., Hierro, E., Ordóñez, J. A. (2000).** Use of carbon dioxide enriched atmospheres in the refrigerated storage (2 °C) of salmon (*Salmo salar*) steaks. *European Food Research and Technology*, 210, 179-188.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Farkas, D. F. (1989).** Effects of high hydrostatic pressure on heat resistant and heat sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54, 1547-1549.

- Huang, E., Mittal, G. S., Griffiths, M. W. (2006). Inactivation of *Salmonella* enteritidis in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. Biosystems Engineering, 94, 403–413.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS, 165–178
- Hurtado, J. L., Montero, P., Borderías, J., Solas, M. T. (2001). High pressure temperature treatment effect on the characteristics of octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. European Food Research and Technology, 213, 22–29.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1986). Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and scientific applications, 181–196. Toronto: University of Toronto Press.
- ILSI EUROPE. (2013). Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. Ilsi Europe Concise Monograph Series. ISBN: 9789078637394.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaapää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. Americal Journal of Cinical Nutricion, 73, 444S–450S
- Jacobsen, C. N., Nielsen-Rosenfeldt, V., Hayford, E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, y col. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Applied and Enviromental Microbiology, 65, 4949–4956.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. Applied and Enviromental Microbiology, 44, 525–532.
- Jay, J. M. (2005). Modern Food Microbiology. 7th edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jenssen, H., Hancock, R. E. W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie, 91, 19–29
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C. (2005). Isolation of comensal bacteria from cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Current Microbiology, 51, 270–274.
- Jin, L., Tao, L., Pavlova, S. I., So, J. S., Kiwanuka, N., Namukwaya, Z. (2007). Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea Jounal of Applied Microbiolgy, 102, 1107–1115.
- Jofré A, Garriga, M., Aymerich, T. (2008). Inhibitions of Salmonella sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. Meat Science, 78, 53–59.
- Johanson, B. (1960). Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chemica Scandinavica, 14, 510–512
- Jones, S. E., Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacclus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. BMC Mircrobiology 2009, 9–35.

- Jørgensen, L. V., Dalgaard, P., Huss, H. H. (2000).** Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2448–2453.
- Jung, D. S., Bodyfelt, F. W., Daeschel, M. A. (1992).** Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 75(2), 387-93.
- Jung, S., de Lamballerie-Anton, M., Ghoul, M. (2000).** Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of post-rigor beef treated by high pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology*, 33, 313–319
- Kalchayanand, N., Dunne, C. P., Sikes, A., Ray, B. (2004).** Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 277-283.
- Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J., Itoh, T. (1997).** Production, purification and characterization of reuterin, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6- *International Journal of Food Microbiology*, 34, 145-156.
- Kandler, O., Stetter K. O., Köhl, R. (1980).** *Lactobacillus reuteri* sp. Nov., a New Species of heterofermentative Lactobacilli. *Zeitschrift für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene C1*, 264-269.
- Kang, D. H., Fung, D. Y. (1999).** Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *Journal of Food Protection*, 62, 975–979.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T., Itoh, T. (2001).** *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical bacteriocin. *Food Microbiology*, 18, 407-415.
- Kennedy, M., O'Rourke, A. L., McLay, J., Simmonds, R. (2000).** Use of a ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 147-158.
- Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., Kapila, R. (2014).** Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 303-319.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. Kok, J. (2003).** Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. 2003. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 1589-1597.
- Kuleaşan, H., Çakmakçı, M. L. (2002).** Effect of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on the surface of sausages to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. *Food/Nahrung*, 46, 408-410.

- Kulshrestha, D. C., Marth, E. H. (1974).** Inhibition of bacteria by some volatile and nonvolatile compounds associated with milk. *Escherichia coli*. Journal of Milk and Food Technology, 37, 510-516.
- Lakshmanan, R., Dalgaard, P. (2004).** Effects of high-pressure processing on *Listeria monocytogenes*, spoilage microflora and multiple compound quality indices in chilled cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology, 96, 398–408.
- Landete, J. M., Langa, S., Revilla, C., Margolles, A., Medina, M., Arqués, J. L. (2015).** Use of anaerobic Green fluorescence protein versus green fluorescent protein as a reporter in acid lactic bacteria. Applied Microbiology and Technology, 99, 6865-6877.
- Langa, S., Arqués, J. L., Gaya, P., Medina, M., Landete, J. M. (2015).** Glycerol and cobalamin metabolism in lactobacilli: relevance of the propanediol dehydrogenase *pdh30*. European Food Research and Technology, 241, 173-184.
- Lammel, T., Boisseaux, P., Fernández-Cruz M. L., Navas, J. M. (2013).** Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Particle and Fibre Toxicology, 12, 10-27.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., Gardini, F. (2003).** Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology, 20, 537-543.
- Leistner, L. (1995)** Principles and applications of hurdle technology. En: New methods of food preservation. Gould, G.W. (ed). Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 1-21.
- Lerche, M., Reuter, G., (1962).** Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. Zentralblatt für Bakteriologie, 185, 446–481.
- Lianou, A., Sofos, J. N. (2007).** A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. Journal of Food Protection, 70, 2172-2198.
- Lin, X. B., Lohans, C. T., Duar, R., Zheng, J., Vederas, J. C., Walter, J y col. (2015).** Genetic determinants of reutericyclin biosynthesis in *Lactobacillus reuteri*. Applied and Environmental Microbiology, 81, 2032-2041.
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS, Microbiology Reviews, 87, 149-164.
- Linton, M., Mc Clements, J. M. J., Patterson, M. F. (2003).** Changes in the microbiological quality of shellfish, brought about by treatment with high hydrostatic pressure. International Journal of Food Science and Technology, 38, 713–727.

- Lionetti, E., Indrio, F., Pavone, L., Borrelli, G., Cavallo, L., Francavilla, R. (2010).** Role of probiotics in pediatric patients with *Helicobacter pylori* infection: A comprehensive review of the literature. *Helicobacter*, 15, 79-87.
- Liu, G, Wang, Y., Gui, M., Zheng, H., Dai, R., Li, P. (2012).** Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. *Food control*, 24, 64-71.
- Livingstone, M., Loach, D., Wilson, M., Tannok, G. W., Baird, M. (2010).** Gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 stimulates an immunoregulatory response. *Immunology and Cell Biology*, 88, 99-102.
- Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., Puhán, Z. (2002).** Production and stability of 3- hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 73-80.
- Ma, H. J., Ledward, D. A. (2004).** High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68, 347-355.
- MacKenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S. (2010).** Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 156, 3368-3378.
- Macpherson, A. J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. (2000).** A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 288, 2222-2226.
- Madsen, K. L., Doyle, J. S., Jewell, L. D., Tavernini, M. M., Fedorak, R. N. (1999).** *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 116, 1107-14.
- Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. (2014).** Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97, 2578-2590.
- Mañas, P., Mackey, B. M. (2004).** Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1545-1554.
- Mao, Y., Nobaek, S., Kasravi, B., Adawi, D., Stenram, U., Molin, G. y col. (1996).** The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology*, 111, 334-44.
- Marcinkiewicz, J., Cizek, M., Bobek, M., Strus, M., Heczko, P. B., Kurnyta, M. y col. (2007).** Differential inflammatory mediator response *in vitro* from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *International Journal of Experimental Pathology*, 88, 155-164.
- Marcos, B., Kerry, J. P., Mullen, A. M. (2010).** High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Science*, 85, 115-120.



- Marín, M. L., Tejada-Simon, M. V., Murtha, J., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1997).** Effects of *Lactobacillus* spp. on cytokine production by RAW 264.7 macrophage and EL-4 thymoma cell lines. *Journal of Food Protection*, 608, 1364-1370.
- Marín, M. L., Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1998).** Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Protection*, 61, 859-864.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J. M. (2005).** Characterization of a reuterin producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 267-277.
- Martínez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G. y col. (2009).** Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 15, 872-882.
- Mason, D. Y., Taylor, C. R. (1978).** Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 31, 316-327.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C. W. (2001).** High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 325-332.
- Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N. y col. (2005).** Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the downregulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 140, 417-426.
- Medina, M., Cabeza, M. C., Bravo, D., Cambero, I., Montiel, R., Ordóñez, J. A., y col. (2009).** A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology*, 26, 224-227.
- Metchnikoff, E. (1907).** Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London, 161-183.
- Minervini, F., Siragusa, S., Faccia, M., Dal Bello, F., Gobetti, M., De Angelis, M. (2012).** Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 95, 508-520.
- Mintel Group Ltd. (2015).** *Global Food & Drink Trends 2016*.
- Mishra, S. K., Malik, R. K., Manju, G., Pandey, N., Singroha, G., Behare, P., Kaushik, J. K. (2012).** Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* bpl-36 strain isolated from human infant fecal sample. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2012.

- Molimard, P., Spinnler, H. E. (1996).** Compounds involved in the flavour of surface mold ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Monfort, S. (2012).** Pasteurización de huevo líquido por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, UNIZAR.
- Montiel, R. (2010).** *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado: detección en la industria y eliminación en el producto mediante altas presiones y bioconservación. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM
- Montiel, R., Bravo D., De Alba, M., Gaya, P., Medina, M. (2012).** Combined effect of high-pressure treatments and the lactoperoxidase system on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 26-32.
- Montiel, R., Cabeza, M. C., Bravo, D., Gaya, P., Cambero, I., Ordóñez, J. A., y col. (2013).** A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: colour, texture, safety and sensory characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3177–3185.
- Montiel, R, Martín-Cabrejas, I, Langa, S., El Aouad, N., Arqués, J.L., Reyes, F. y col. (2014a).** Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, 44, 1-5.
- Montiel, R, Martín-Cabrejas, I, Gaya, P., Medina, M. (2014b).** Reuterin and high hydrostatic pressure treatments on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and effect on the characteristics of cold-smoked salmon. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 2319–2329.
- Montiel, R., Bravo, D., Martín-Cabrejas, I., Gaya, P., Arqués, J. L., Medina, M. (2014c)** *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado: inactivación mediante altas presiones y Bioconservación. *Alimentaria*, 455, 80-88.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M. (2015a).** Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-borne pathogens in cooked ham. *Food Control*, 51, 122-128.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M. (2015b).** Natural antimicrobials and high pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in cold-smoked salmon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Morales, P., Calzada, J., Nuñez, M. (2006).** Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged Iberian and Serrano cured hams. *Journal of Food Protection*, 69, 2539-2543.
- Morales, P., Calzada, J., Nuñez, M. (2008).** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef by Single-Cycle and Multiple-Cycle High-Pressure Treatments. *Journal of Food Protection*, 4, 811-815.



- Morales, P., Calzada, J., Rodríguez, B., De Paz, M., Nuñez, M. (2009).** Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 577-581.
- Morehouse, K. M. (2002).** Food irradiation-US regulatory considerations. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 281-284.
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., y col. (2008).** Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Research*, 15, 151-161.
- Moro C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A. y col. (2012).** Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130, 350-355.
- Murch, S. H., Braegger, C. P., Walker-Smith, J. A., MacDonald, T. T. (1993)** Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 34, 1705-1709.
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., Chikindas, M. L. (2007).** The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 255-261.
- Naidu, A. S. (2000).** Lactoperoxidase. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*, 103-132. Boca Raton, FL, EEUU: CRC Press.
- Naito, S., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Benno, Y. (1995).** Development of intestinal lactobacilli in normal piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 79, 230-236.
- Narisawa, N., Furukawa, S., Kawarai, T., Ohishi, K., Kanda, S., Kimijima, K., y col. (2008)** Effect of skimmed milk and its fractions on the inactivation of *Escherichia coli* K12 by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 103-107.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, January 1998, 142-201.
- Niv, E., Naftali, T., Hallak, R. Vaisman, N. (2005).** The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with irritable bowel syndrome: a double blind, placebo-controlled, randomized study, *Clinical Nutrition*, 24, 925-931.
- Nomoto, K. (2005).** Review: Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 583-92.
- Nuñez, M., Gaya, P., Medina, M. (1985).** Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 794-800.

- Nuñez, M., Rodríguez, J. L., García, E., Gaya, P., Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology, 83, 671-677.
- Okada, Y., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Komoto, S., Kurihara, C., Kawaguchi, y col. (2009). Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I $\beta$ B and SOCS gene expression. International Journal of Experimental Pathology, 90, 131-140.
- Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Letters in Applied Microbiology, 37, 448-451.
- Ordóñez, J. A., Juárez, M., Zurera, G. Otero, A. (2004). Aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos.
- O'Brien, P. J., Siraki, A. G., Shangari, N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. Critical Reviews in Toxicology, 35, 609-62.
- O'Bryan, C. A., Sostrin, M. L., Nannapaneni, R., Ricke, S. C., Crandall, P. G., Johnson, M. G. (2009). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Scott A to nisin and diacetyl after starvation in sodium phosphate buffered saline. Journal of Food Science, 74, 493-498.
- O'Mahony, L., O'Callaghan, L., McCarthy, J., Shilling, D., Scully, P., Sibartie, S., y col. (2006). Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 290, 839-845.
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. Journal of Applied Microbiology, 98, 1400-1409.
- Peña, J. A., Versalovic, J. (2003). *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. Cellular Microbiology, 5, 277-285.
- Peran, L., Sierra, S., Comalada, M., Lara-Villoslada, F., Bailón, E., Nieto y col (2007). A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. British Journal of Nutrition, 97, 96-103.
- Pérez, C. (2015). Probióticos en la diarrea aguda y asociada al uso de antibióticos en pediatría. Nutrición hospitalaria, 31, 64-67.
- Prados-Bo, A., Gómez-Martínez, S., Nova, E., Marcos, A. (2015). El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad. Nutrición Hospitalaria, 31, 10-18.

- Pranoto, Y., Rakshit, S., Salokhe, V. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. Food Science and Technology, 38, 859–865.
- Rahn, C. H., Schlenk, H. (1973). Detection of aldehydes with 4-amino-5-hydrazino- 1,2,4-triazole-3-thiol as spray reagent. Lipids, 8, 612-616.
- Rasch, M., Barker, G. C., Sachau, K., Jakobsen, M., Arneborg, N. (2002). Characterisation and modelling of oscillatory behaviour related to reuterin production by *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology, 73, 383-394.
- Rasch, M., Métris, A., Baranyi, J., Bjørn Budde, B. (2007). The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. International Journal of Food Microbiology, 1, 35-40.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, F., Gajer, P. y col. (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. Journal of Bacteriology, 190, 6881-6893.
- Rasko, D. A., Webster, D. R., Jason, W. S., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F. y col. (2011). Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany. New England Journal of Medicine, 365, 709-717.
- Rautava, S., Collado, M. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2012). Probiotics modulate host-microbe interaction in the placental and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neonatology, 102, 178-184.
- Realini, C. E., Guàrdia, M. D., Garriga, M., Pérez-Juan, M., Arnau, J. (2011). High pressure and freezing temperature effect on quality and microbial inactivation of cured pork carpaccio. Meat Science, 88, 542–547.
- Reiter, B., Härnqvist, G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. Journal of Food Protection, 47, 724-732.
- Rincón-Delgadillo, M. I., López-Hernández, A., Wijaya, I., Rankin, S. A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. Journal of Dairy Science, 95, 1128–1139.
- Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M., Chapleau, N., de Lamballerie, M. (2008). Effects of high pressure, subzero temperature, and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in buffer and smoked salmon. Journal of Food Protection, 71, 1612–1618.
- Rocourt, J., Jaquet, C., Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. International Journal of Food Microbiology, 62, 197-209.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En: *Listeria*, listeriosis and food safety, 1-20. Ed. Ryser ET y Marth EH. CRC Press, Boca Raton, FL., EEUU.

- Rodes, L., Khan, A., Paul, A., Coussa-Charley, M., Marínescu, D., Tomaro-Duchesneau, C. (2013). Effect of Probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 518–526.
- Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Nuñez, M., y Medina, M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 259–263.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J. M., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 51–57.
- Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Peirotén, A., Landete, J. M., Medina, M. (2012). Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods*, 4, 542–551.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 33–47.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Vezza, T., Garrido-Mesa, N., Olivares, M., Comalada, M. y col. (2015). The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food and Function*, 6, 1176–1184.
- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X. y col. (2015). Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BioMed Central, Microbiology*, 15, 196–206.
- Rørvik, L. M., Caugant, D. A., Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 19–27.
- Rovere, P. (1995). The third dimension of food technology. *Tecnologie Alimentari*, 4, 64–78.
- Russell, N., J., Hardcover, G., W., G. (2003). *Food Preservatives* (Second Edition), 386 páginas. ISBN-10: 0-306-47736-X.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H. Franck, A.; Gibson, G. y col. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(suppl), 147–171.
- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K. G., Metaxopoulos, J. (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 649–660.
- San Martín, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 627–645.

- Sartor, R. B. (2004).** Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology*, 126, 1620-1633.
- Sarra, P. G., Fulgoni, M., Battazzi, V. (1985).** Taxonomy of lactobacilli isolated from the alimentary tract of chickens. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 86-89.
- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J-M., Auffray, Y. (2000).** Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3- hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 167-170.
- Savado, A., Ouattara, A. T., Bassole, H. N., Traore, S. A. (2006).** Bacteriocins and lactic acid bacteria—a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678-683.
- Savino, F., Cordisco, L. (2010).** *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: A randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Pediatrics*, 126, e526
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L. y col. (2011).** Foodborne illness acquired in the United States mayor pathogens. *Emerging and infection disease*, 17, 7-15.
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., Britton, R. A. (2010).** The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology-SGM*, 156, 1589-1599.
- Schanda, J. (2007).** Understanding the CIE system, 25-78. New York: Wiley.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H., Zollner, H. (1977).** Aldehydes biological systems. Pior, Academic Press, Londres.
- Schmid-Hempel, P., Frank, S. A. (2007).** Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathogens*, 3, e147.
- Schütz, H., Radler, F. (1984).** Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 5, 169-178.
- Seifu, E., Buys, E. M., Donkin, E. F. (2005).** Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 137-154.
- Seril, D. N., Liao, J., Yang, G-Y. Yang, C. S. (2003).** Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*, 24, 353-362.
- Sheil, B., Shanahan, F., O'Mahony, L. (2007).** Probiotic Effects on Inflammatory Bowel Disease. *The Journal Nutrition*, 3, 819-824.
- Shifrin, H., Nadler-Milbuer, M. Shoham, S., Weinstock, M. (2013).** Rivastigmine Alleviates Experimentally Induced Colitis in Mice and Rats by Acting at Central and Peripheral Sites to Modulate Immune Responses. *PLoS ONE*, 8, e57668.
- Shindler, J. S., Childs, R. E., Bardsley, W. G. (1976).** Peroxidase from human cervical mucus. *European Journal of Biochemistry*, 65, 325-331.

- Shornikova, A. V., Casas, I. A., Isolauri, E., Mykkänen, H., Vesikari, T. (1997a).** *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 24, 399–404.
- Shornikova, A., Casas, I. A., Mykkänen, H., Salo, E., Vesikari, T. (1997b).** Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric Infection Disease Journal*, 6, 1103–1107.
- Simonin, H., Duranton, F., de Lamballerie, M. (2012).** New insights into the high pressure processing of meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 285–306.
- Singer, M., Sansonetti, P. J. (2004).** IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis. *Journal of Immunology*, 173, 4197–4206.
- Sinkiewicz, G. (2010).** *Lactobacillus reuteri* in health and disease. Malmö University Health and Society Doctoral Dissertation, 2010:3.
- Siragusa, G. R., Johnson, M. G. (1989).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antimicrobial system. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2008–2015.
- Sloan, A. E. (2015).** The top ten food trends. *Food Technology Magazine*, 69(4).
- Smelt, J. P. P. M. (1998).** Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 152–158.
- Smiley, K. L., Sobolov, M. (1962).** A cobamide-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 97, 538–543.
- Sørensen, M. Sørensen, S. P. L. (1939).** The proteins in whey. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 23, 55–99.
- Spanjer, M. C., van Roode, B. A. S. W. (1991).** Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese and sauerkraut. *De Ware (n)-Chemicus*, 21, 139–167.
- Spinnler, H. E. Gripon, J. C. (2004).** Surface mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 157–174. Academic Press.
- Spinler, J. K., Taweetchotipatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwarsorn, S., Versalovic J. (2008).** Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14, 166–171.
- Sriramulu, D. D., Liang, M., Hernandez-Romero, D., Raux-Deery, E., Lunsdorf, H., Parsons, J. B. y col. (2008).** *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 produces cobalamin dependent diol dehydratase in metabolosomes and metabolizes 1,2-propanediol by disproportionation. *Journal of Bacteriology*, 190, 4559–4567.
- Steel, J. H., Malatos, S., Kennea, N., Edwards, A. D., Miles, L., Duggan, P. y col. (2005).** Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes. *Pediatric Research*, 57, 404–411.



- Stekelenburg, F. K., Kant-Muermans, M. L. T. (2001).** Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 197–203.
- Stevens, M., Vollenweider, S., Lacroix, C. (2011).** The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. In C. Lacroix (Ed.), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*, 129-160. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Stout, M. J., Conlon, B., Landeau, M., Lee, I., Bower, C., Zhao, K Q. y col. (2013).** Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208, 226e1–226e7.
- Suárez, J. E. (2015).** Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 3-9.
- Sun, X. D., Holley, R. A. (2010).** High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75, R17–R23.
- Sung, H., Chen, C., Liang, H., Hong, M. (2003).** A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. *Biomaterials*, 24, 1335-1347.
- Suzuki, Y. A., López, V., Lonnerdal, B. (2005).** Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2560-2575.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M. L., Gaertner, K., Von Engelhardt, W. (1990).** Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochemical Journal*, 22, 491–497.
- Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, T., Honda, H., Oshima, Y. y col. (2010).** Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *Journal of Immunology*, 184, 2671-2676.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. (2009).** Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiology*, 26, 783–793.
- Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J. (1988).** Production and isolation of reuterin, -a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1854–8.
- Talarico, T. L., Dobrogosz, W. J. (1989).** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 674–679.
- Talarico, T. L., Axelsson, L. T., Nvotny, J., Fiuzat, M., Dobrogosz, W. J. (1990).** Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 943-948.
- Talaro, K. P., Chess, B. (2015).** *Foundations in Microbiology*. 9th Edition, New York. McGraw Hill Education. 929 pp.

- Taylor, S., Brock, J., Kruger, C., Berner, T., Murphy, M. (2004).** Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 12-24.
- Tejada-Simón, M.V., Pestka, J. J. (1999).** Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 62, 1435-1444.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., Huis in't Veld, J. H. J. (1990).** Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84.
- Tesfai, A. T., Beamer, S. K., Matak, K. E. Jaczynski, J. (2011).** Microbial radio-resistance of *Salmonella Typhimurium* in egg increases due to repetitive irradiation with electron beam. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 591-596.
- Thomas, T. D., Pritchard, G. G. (1987).** Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 245-268.
- Tiekink, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2003).** *In situ* production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 945-952.
- Tissier, H. (1900).** Reserches sur la flore intestinale des nourissons (état normal et pathologique). Paris: G. Carre and C. Naud.
- Toba, T., Samant, S. K., Yoshioka, E., Itoh, T. (1991).** Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 281-286.
- Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S. (1980).** Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*, 141, 1439-1442.
- Tubelius, P., Stan, V., Tubelius, A. Z. (2005).** Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: A randomised, double-blind placebo-controlled study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 4-25.
- Tungjaroenchai, W., White, C. H., Holmes, W. E., Drake, M. A. (2004).** Influence of adjunct cultures on volatile free fatty acids in reduced-fat Edam cheeses. *Journal of Dairy Science*, 87, 3224-3234.
- Työppönen, S., Petäjä, E., Mattila-Sandholm, T. (2003).** Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 233-244.
- Ulmer, C., Zeng, A. P. (2007).** Microbial production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 21, 321-326.
- Utrilla, M. P., Peinado, M. J., Ruiz, R., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., y col. (2015).** Pea (*Pisum sativum* L.) seed albumin extracts show anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 807-819.



- Valenti, P., Antonini, G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 2576-2587.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E. Ladefoged, K. (2004). Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 70, 1176-1181.
- Vardakou, M. Nueno-Palop, C., Christakopoulos, P., Faulds C. B., Gasson M. A., Narbad, A. (2008). Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. International Journal of Food Microbiology, 123, 166-170.
- Veland, J. O., Torrissen, O. J. (1999). The texture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle measured instrumentally using TPA and Warner-Bratzler shear test. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1737-1746.
- Vercammen, A., Vanoirbeek, K. G. A., Lurquin, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., y col. (2011). Shelf-life of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural additives. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12, 407-415.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36, 895-904.
- Vogel, R. F. Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W. y col. (1994). Identification of Lactobacilli from Sourdough and Description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. International Journal of Sistematic and Eolutionary Microbiology, 44, 223-229.
- Voigt, D. D., Chevalier, F., Qian, M. C., Kelly, A. L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 68-77.
- Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., Puhán, Z. (2003). Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3287-3293.
- Vollenweider, S., Lacroix, C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 16-27.
- Vollenweider, S., Evers, E., Zurbruggen, K., Lacroix, C. (2010). Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10315-10322.
- Vorland, L. H., Ulvatne, H., Rekdal, O., Svendsen, J. S. (1999). Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 31, 467-473.

- Warriner, K., Namvar, A. (2009).** What is the hysteria with *Listeria*? Trends in Food Science and Technology, 20, 245-254.
- Weizman, Z., Asli, G. Alsheikh, A. (2005).** Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents, Pediatrics, 115, 5-9.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann M., y den Bakke H. C. (2015).** *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis*, sp. nov., from food processing environments in the EEUU. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 286-292.
- Wells, J. M. (2011).** Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. Microbial Cell Factories, 10, S17.
- WGO, Practise guidelines. Probióticos y prebióticos. (2011).** Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología, Octubre, 2011.
- WHO (1999).** Report of a join FAO/IAEA/WHO Study Group. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. WHO Technical Report Series, 890.
- Wolf, B. W, Garleb, K. A., Atalaya, D. G., Casas, I. A. (1995).** Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult male subjects. Microbial Ecology and Health Disease, 8, 41-50.
- World Bank. (2010).** People, Pathogens and Our Plant, Vol 1: Towards a Once Health Approach for Controlling. Zoonotic Diseases Report 50833-GLB.
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. A., Tabatabaie, F. (2008).** The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. African Journal of Biotechnology, 7, 2739-2767.
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Ito, H. (2000).** IL-6 is required for the development of Th1 cell mediated murine colitis. Journal of Immunology, 164, 4878-82.
- Yamashita, M. H., Niki, M., Yamada, S. M., Ohuchi, K. (1997).** Induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharide and its inhibition by auranofin in RAW 264.7. European Journal of Pharmacology, 338, 151-158.
- Yunmbam, M. K., Roberts J. F. (1993).** *In vivo* evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 105, 521-524.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Sendra, E., Beltrán, E., Mor-Mur, M. (2001).** Oscillatory high pressure processing applied to mechanically recovered poultry meat for bacterial inactivation. Food Microbiology and Safety, 66, 482-484.
- Zapico, P., Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (1998).** Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. International Journal of Food Microbiology, 40, 35-42.

- Zeppa, G., L. Conterno, Gerbi, V. (2001).** Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2722–2726.